

Kotimaisten marjojen lisäys sekaruokavalioon muuttaa
ulosteveden ominaisuuksia –

Marjojen vaikutus ulosteveden
polyfenolimetaboliitteihin ja ulostevedelle
altistettujen paksusuolisyöpäsolujen viabiliteettiin

Pro Gradu -tutkielma

Tuulia Ingman

Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto

Helsingin yliopisto

Ohjaajat: Anne-Maria Pajari, yliopistonlehtori, dosentti; Essi Päivärinta, ETT

Tiedekunta - Fakultet Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos - Institution Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto
Tekijä - Författare Tuulia Elina Ingman		
Työn nimi - Arbetets titel Kotimaisten marjojen lisäys sekaruokavalioon muuttaa ulosteveden ominaisuuksia – Marjojen vaikutus ulosteveden polyfenolimetaboliitteihin ja ulostevedelle altistettujen paksusuolisyöpäsolujen viabiliteettiin		
Oppiaine - Läroämne - Ravitsemustiede		
Työn laji - Arbetets art Pro gradu	Aika - Datum Huhtikuu 2018	Sivumäärä - Sidoantal 59 sivua + liitteet 8 sivua
<p>Tiivistelmä - Referat</p> <p>Tausta ja tavoitteet: Marjat ja niiden polyfenolit estävät syöpäkasvaimien kasvua <i>in vivo</i> ja kasvainsolujen kasvua <i>in vitro</i>. Polyfenolit muokkautuvat suolistossa mm. fenolisiksi hapoiksi, jotka saattavat selittää osan niiden bioaktiivisuudesta. Nämä ja muut ulosteen nestefraktion eli nk. ulosteveden yhdisteet ovat kosketuksissa suolikuopakkeiden jakautuvien epiteelisolujen kanssa, ja voivat vaikuttaa syöpäriskiin. Tämän työn tavoitteena oli tutkia, muuttaako neljän viikon runsas marjojen syönti ulosteveden vaikutusta paksusuolisyöpäsolujen ja fibroblastien jakautumiseen ja/ tai elossa pysymiseen eli viabiliteettiin kontrolliryhmään nähden <i>in vitro</i>, kun punaisen lihan määrä ruokavaliossa on vakioitu. Lisäksi tutkittiin, onko ulosteveden polyfenolimetaboliittien pitoisuuksilla yhteyttä solujen viabiliteettiin.</p> <p>Aineisto ja menetelmät: KarniMari oli neljän viikon satunnaistettu interventio, jossa kahdesta ryhmästä toisen ryhmän henkilöt söivät tutkimusjakson ajan päivittäin noin 200 g marjoja. Kaikki tutkittavat söivät päivittäin 150 g sianlihatuotteita. Tutkimuksen alussa ja lopussa kerättiin ulostenäytteet, joista eristettiin ulostevesi. Loppupisteen näytteistä määritettiin polyfenolimetaboliittien pitoisuuksia UHPLC-DAD-FLD-menetelmällä. Ihmisen paksusuolisyöpäsoluja (Caco-2 ja HCA-7) sekä apinan fibroblasteja (CV1-P) altistettiin laimennetuille ulostevesille (10 % / 20 % / 30 % ulostevedellä) vuorokauden ajan, ja viabiliteetti määritettiin solujen dehydrogenaasientsyymin aktiivisuuteen perustuvalla menetelmällä. Solujen viabiliteetin eroa ryhmien välillä intervention jälkeen testattiin kovarianssianalyysillä (ANCOVA). Ulostevden fenolisten happojen pitoisuuden ryhmien välistä eroa loppupisteessä sekä solujen viabiliteetin eroa lähtötilanteessa testattiin Mann-Whitney U-testillä. Fenolisten happojen pitoisuuksien yhteyttä solujen viabiliteettiin testattiin Spearmanin korrelaatiotestillä.</p> <p>Tulokset: Intervention jälkeen marjaryhmän ulostevesi vähensi solujen viabiliteettia enemmän kuin kontrolliryhmän ulostevesi. Ero oli tilastollisesti merkitsevä kaikilla solulinjoilla ulosteveden pitoisuuden ollessa 30 % (HCA-7 p<0.001; Caco-2 p=0.032; CV1-P p=0.009), sekä soluilla HCA-7 (p=0.007) ja CV1-P (p=0.003) myös ulosteveden pitoisuuden ollessa 20 %. Marjaryhmän ulostevedessä oli intervention jälkeen suurempia pitoisuuksia protokatekiinihappoa (p=0.027) ja p-kumariinihappoa (p=0.003) kuin kontrolliryhmän ulostevedessä. Viabiliteetilla ja p-kumariinihapon pitoisuudella oli merkitsevä käänteinen yhteys kaikilla solulinjoilla ulostevesipitoisuuden ollessa 20 % tai 30 %, vaikka p-kumariinihapon pitoisuudet olivat pieniä.</p> <p>Johtopäätökset: Marjoja syöneiden tutkittavien ulostevesi rajoitti sekä kasvainsolujen että fibroblastien kasvua enemmän kuin kontrolliryhmän ulostevesi. Marjojen syönti tuotti ulosteveteen suurempia protokatekiinihapon ja p-kumariinihapon pitoisuuksia. p-Kumariinihappo saattaa vähentää viabiliteettia tai olla yhteydessä toiseen vaikuttavaan tekijään ulostevedessä. Jatkotutkimuksissa tulisi selvittää tarkemmin, millä mekanismeilla marjoja syöneiden ulostevesi vaikutti solujen viabiliteettiin.</p>		
Avainsanat – Nyckelord Ravitsemus, marjat, polyfenolit, fenoliset hapot, paksusuolisyöpä, ulostevesi, solun viabiliteetti		
Säilytyspaikka - Förvaringsställe MMTDK, Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto		
<p>Muita tietoja - Övriga uppgifter</p> <p>Ohjaajat: Anne-Maria Pajari, yliopistonlehtori, dosentti; Essi Päivärinta, ETT</p>		

Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Department Department of Food and Nutrition
Author Tuulia Elina Ingman		
Title Adding berries to a mixed diet changes fecal water properties – content of polyphenol metabolites and the impact of fecal water on colon cancer cell viability		
Subject Nutrition		
Level Master's thesis	Month and year April 2018	Number of pages 59 pages + attachments 8 pages
Abstract <p>Background and aim of the study: Berries and berry polyphenols inhibit the growth of cancerous tumors <i>in vivo</i> and cancer cells <i>in vitro</i>. In the digestive system polyphenols are converted to various metabolites, such as phenolic acids, which may partially count for polyphenol bioactivity. These and other components in the liquid fraction of feces, i.e. the fecal water, are in contact with the proliferating cells residing at the bottom of colonic crypts, and may therefore affect colon cancer risk. The aim of this study was to investigate whether berry consumption changes the effect of fecal water on colon cancer cell viability <i>in vitro</i>, when the amount of dietary red meat is controlled. Also of interest was to investigate the possible correlation between fecal water phenolic acids and the viability of fecal water-exposed cells.</p> <p>Materials and methods: Karnimari was a four-week randomized intervention study with two study groups; one receiving 200 g berries and 150 g pork products daily, and the other group receiving pork products only. Fecal samples were collected before and after intervention and fecal waters were extracted. Polyphenol metabolites from end-point fecal waters were analyzed using UHPLC-DAD-FLD-method. Human colon cancer cells (Caco-2 ja HCA-7) and monkey fibroblasts (CV1-P) were exposed to diluted fecal waters (10 % / 20 % / 30 % fecal water) for 24 h, and cell viability was measured with a method based on cellular dehydrogenase activity. The difference in cell viability between groups after intervention was tested with covariance analysis (ANCOVA). The difference in fecal water concentration of phenolic acids between groups after intervention and the difference in cell viability between groups before intervention were tested with Mann-Whitney U-test. The correlations between fecal water phenolic acids and cell viability were tested with Spearman's correlation.</p> <p>Results: After intervention fecal waters from the berry group reduced cell viability more than fecal waters from the control group. The difference was significant in all three cell lines when fecal water concentration in cell medium was 30 % (HCA-7 $p<0.001$; Caco-2 $p=0.032$; CV1-P $p=0.009$), and in cells HCA-7 ($p=0.007$) and CV1-P ($p=0.003$) also when fecal water concentration was 20 %. The concentrations of fecal water protocatechuic acid ($p=0.027$) and p-coumaric acid ($p=0.003$) were greater in the berry group than in the control group. p-Coumaric acid concentration was significantly correlated with cell viability in all cell lines when fecal water concentration in cell medium was 20 % or 30 %, regardless of the relatively small amounts of p-coumaric acid detected.</p> <p>Conclusions: Fecal waters from the berry group reduced the viability of both colon cancer cell lines and fibroblasts more than fecal waters from the control group. Eating berries led to greater amounts of protocatechuic acid and p-coumaric acid in fecal water. p-Coumaric acid may reduce cell viability or be connected to another affective component in fecal water. The biological mechanisms behind the cell viability reducing ability of fecal water from berry eating subjects should be further investigated.</p>		
Keywords Nutrition, berries, polyphenols, phenolic acids, colon cancer, fecal water, cell viability		
Säilytyspaikka - Förvaringsställe - Where deposited Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Food and Nutrition		
Muita tietoja - Övriga uppgifter - Additional information Supervisors: Anne-Maria Pajari, University Lecturer, Adjunct Professor; Essi Päivärinta, Postdoctoral Researcher		

Sisältö

1 Johdanto.....	1
2 Katsaus kirjallisuuteen.....	4
2.1 Paksusuolisyövän kehittyminen	4
2.1.1 Paksusuolisyövän patogeneesi.....	4
2.1.2 Paksusuolisyöpä ja suolen luumenin olosuhteet	7
2.2 Marjojen polyfenolit ja paksusuolisyöpä	10
2.2.1 Marjat polyfenolien lähteenä suomalaisilla	11
2.2.2 Marjojen polyfenolien aineenvaihdunta ruoansulatuskanavassa	13
2.2.3 Kokeelliset marjatutkimukset paksusuolisyöpäpotilailla	17
2.2.4 Kokeelliset marjatutkimukset eläimillä	19
2.2.5 Solukokeet in vitro -fermentoiduilla marjoilla	20
3 Tutkimuksen tavoitteet	23
4 Aineisto ja menetelmät	24
4.1. Interventio ja ulostenäytteiden keräys	24
4.2 Ulosteveden eristys ja fenolisten happojen määrittäminen	25
4.3 Soluviljelmien aloitus ja ylläpito.....	26
4.4 Ulostevesialtistuskoe.....	27
4.5 Ulosteveden ja CCK-8 -reagenssin interaktion testaus	31
4.6 Tilastolliset analyysit	32
5 Tulokset	33
5.1 Marjaruokavalion vaikutus ulostevedelle altistettujen solujen viabiliteettiin.....	33
5.2 Ulosteveden vaikutus eri solulinjojen viabiliteettiin	36
5.3 Ulosteveden polyfenolimetaboliittien pitoisuudet loppupisteessä.....	36
5.4 Ulosteveden polyfenolimetaboliittien pitoisuuksien yhteys solujen viabiliteettiin.....	37
5.5 Ulosteveden happamuus (pH)	39
6 Pohdinta	41
6.1 Tutkimuksen tavoitteet ja lopputulos	41
6.2 Solujen viabiliteetti.....	41
6.3 Polyfenolimetaboliitit.....	43
6.4 Ulosteveden happamuus (pH)	45
6.5 Tutkimuksen virhelähteet	46
6.6 Tuloksien yleistettävyyden	48
6.7 Tutkimuksen vahvuudet.....	49

7 Johtopäätökset.....	50
Kiitokset.....	51
Lähdeluettelo	52
Liitteet	60
Liite 1 Ohjeet ulostenäytteen ottoa varten.....	60
Liite 2. Esimerkkikuvia soluista.....	62
Liite 3. Ulosteveden ja cck-8-reagenssin interaktion testaus.....	65
Liite 4. Solujen viabiliteetit ulostevesialtistuksen jälkeen intervention alkupisteessä	66
Liite 5: Solujen viabiliteetin muutos intervention alkupisteestä loppupisteeseen.....	67

1 Johdanto

Paksusuolisyöpää esiintyy maailmanlaajuisesti sekä miehillä että naisilla (Bishayee ym. 2016). Käytössä olevat syöpähoidot eivät suurista kustannuksista ja voimakkaista sivuvaikutuksista huolimatta paranna kaikkia pitkälle edenneitä syöpiä. Alkuvaiheessa todettujen suolistosyöpien ennuste on hyvä. Kuitenkin alle 5 % potilaista, joilla syöpä on jo ehtinyt levitä, on elossa viiden vuoden kuluttua sairauden toteamisesta (Mecklin ym. 2016). Periytyvät geneettiset poikkeamat ovat osallisena arviolta 15-30 %:ssa paksusuolisyöpätapauksista, ja näistä noin neljännes on perinnöllisiä syövälle altistavia syndroomia (Fearon 2011). Valtaosa paksusuolisyövistä on kuitenkin seurausta satunnaismutaatioista, joiden syntyyn erilaiset ympäristötekijät voivat vaikuttaa.

Ruokavaliolla on merkitystä etenkin ruoansulatuskanavan syöpien kehittämisessä (Bishayee ym. 2016). Viimeaikaisten tapaus-verroki - ja kohorttitutkimusten perusteella runsaasti kasvipäisiä ja niukasti eläinperäisiä ruoka-aineita sisältävät ruokavaliot ovat yhteydessä pienempään paksusuolisyöpäriskiin (Steck ym. 2015). Maailman syöväntutkimussäätiön tuoreimman raportin (WCRF / AICR 2017) mukaan on vahvaa näyttöä siitä, että punaisen lihan ja prosessoidun lihan runsas käyttö on yhteydessä suurempaan paksusuolisyövän riskiin. Täysjyväviljojen, kuitupitoisten ruoka-aineiden, maitotuotteiden ja kalsiumlisän käyttö ovat puolestaan yhteydessä pienempään paksusuolisyövän riskiin. Jonkin verran näyttöä on myös C-vitamiinipitoisten ruoka-aineiden, kalan, D-vitamiinin ja monivitamiinilisän käytön suojaavasta vaikutuksesta. Kasvien ja hedelmien vähäinen käyttö sekä hemiraudan eli eläinperäisen raudan saanti ovat raportin mukaan yhteydestä suurempaan sairastumisriskiin, mutta tutkimusnäyttöä tästä on toistaiseksi rajallisesti (WCRF / AICR 2017).

Valtaosa paksusuolisyöpätapauksista ilmenee teollistuneissa maissa, minkä vuoksi syyksi on esitetty länsimaista ruokavaliota ja liikunnan puutetta (Pericleous ym. 2013). Punaisen lihan yhteyttä suurempaan syöpäriskiin saattaa selittää lihapitoisen ruokavalion usein muutenkin puutteellinen ravitsemuksellinen laatu, mutta punaisen lihan runsas kulutus myös lisää syöpävaarallisten yhdisteiden pitoisuutta elimistössä. Kypsennettäessä ja suoliston mikrobitoiminnan seurauksena lihasta muodostuu muun muassa karsinogeenisiä heterosyklisiä amiineja sekä N-nitrosoyhdisteitä, joiden muodostumista

punaisen lihan korkea hemirautapitoisuus tehostaa (Pericleous ym. 2013). Kala ja siipikarjan liha ovat punaista lihaa korvaavia proteiininlähteitä, ja niiden käyttö onkin yhdistetty pienempään paksusuolisyöpäriskiin (Pericleous ym. 2013).

Paksusuolisyöpää esiintyy vain vähän sellaisissa afrikkalaisissa väestöissä, joiden ruokavaliossa on runsaasti kuitua (Burkitt 1969). Kuidun arvellaan suojaavan syövältä nopeuttamalla suolen läpikulkuaikaa, laimentamalla suolen sisältöä, sitomalla karsinogeneeneja, muokkaamalla sappihappojen aineenvaihduntaa, ylläpitämällä suolen epiteelin eheyttä, fermentoitumalla lyhytketjuisiksi rasvahapoiksi ja vaikuttamalla suolen epiteelisolujen jakautumisaktiivisuuteen (Pericleous ym. 2013). Kasvipäristen ruoka-aineiden suojaavan vaikutuksen arvellaan olevan ravintoaineiden ja kuidun lisäksi kasvien fytokemikaalien ansiota. Erityisesti polyfenolien vaikutusta syövän kehittymiseen tutkitaan, sillä niiden tiedetään muun muassa toimivan antioksidanteina, vähentävän syöpäsolujen jakautumista, käynnistävän ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin, ja vähentävän kasvaimien verisuonten uudismuodostusta sekä metastaasia eli kasvaimen leviämistä ympäröivään kudokseen (Pericleous ym. 2013, Ramos 2008). Polyfenolit muokkautuvat suolistossa erilaisiksi metaboliiteiksi, jotka saattavat selittää osan polyfenolien bioaktiivisuudesta (Tomás-Barberán ym. 2016).

Epidemiologisissa tutkimuksissa havaittujen ravinnon ja paksusuolisyövän välisten yhteyksien osoittaminen syy-seuraussuhteesta johtuviksi on haastavaa, sillä syöpämuutokset kehittyvät pitkällä aikavälillä (Pearson ym. 2009). Kokeelliseen ihmistutkimukseen tarvittaisiin suuri joukko tutkittavia, sen tulisi olla pitkäkestoinen ja sen asetteluun liittyisi eettisiä haasteita. Tämän vuoksi vasteena pyritään käyttämään varsinaisten syöpätapausten sijaan niin kutsuttuja biomarkkereita eli syöpäriskiin liittyviä mitattavia tekijöitä. Ulosteeissa on vaihtelevina pitoisuuksina paksusuolisyöpäriskiin mahdollisesti vaikuttavia ravintoperäisiä yhdisteitä, minkä vuoksi siitä toivotaan löytyvän paksusuolisyövän riskiä kuvaavia biomarkkereita. Suolen sisällön nestemäisen osan eli ulosteveden oletetaan vaikuttavan paksusuolisyöpäriskiin todennäköisemmin kuin kiinteän aineksen, sillä se on suoraan kosketuksissa suolikuopakkeiden pohjalla sijaitsevien jakautuvien solujen kanssa (Pearson ym. 2009, Rafter ym. 1987). Mitään ulosteveden ominaisuutta ei kuitenkaan vielä ole osoitettu paksusuolisyöpäriskin biomarkkeriksi etenevien tutkimusten perusteella.

KarniMari-tutkimus oli neljän viikon ravitsemusinterventio, jonka aikana kaksi ryhmää terveitä aikuisia söivät vakioidun määrän punaista lihaa päivittäin. Toinen ryhmä söi lisäksi päivittäin noin 200 g kotimaisia marjoja; mansikkaa, mustikkaa, puolukkaa, vadelmaa, mustaherukkaa ja lakkaa. Ennen tutkimusjakson alkua ja sen lopussa kaikilta tutkittavilta kerättiin ulostenäytteet. Näytteistä eristettiin ulostevesi ja määritettiin polyfenolimetaboliittien pitoisuuksia. Tässä gradutyössä tutkittiin KarniMari-intervention ulostevesien vaikutusta paksusuolisyöpäsolujen ja sidekudossolujen viabiliteettiin eli jakautumiseen ja / tai elossa pysymiseen soluviljelmässä. Lisäksi tutkittiin, onko ulostevedelle altistettujen solujen viabiliteetti yhteydessä ulosteesta määritettyjen fenolisten happojen pitoisuuksiin.

2 Katsaus kirjallisuuteen

2.1 Paksusuolisyövän kehittyminen

Paksusuolisyöpä on monitekijäinen, monivaiheinen ja pitkän ajan kuluessa kehittyvä sairaus (Derry ym. 2013). Geneettiset muutokset ovat osa syövän initiaatiota, promootiota ja progressiota (Rafter ym. 2004). Paksusuolisyöpään johtava geneettisten mutaatioiden sarja on tapauskohtainen, ja tarkkaan ottaen paksusuolisyöpä onkin nimitys joukolle erilaisia paksusuolen epiteelin syöpiä (Núñez-Sánchez ym. 2015). Ympäristötekijät voivat vaikuttaa syövän kehittymiseen sen kaikissa vaiheissa (Derry ym. 2013).

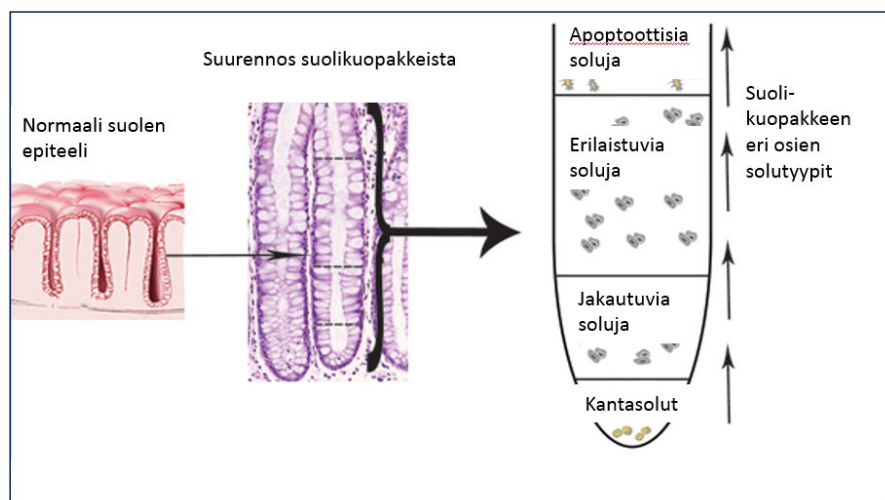
Normaalin solun ylläpitojärjestelmät tarkistavat ja korjaavat genomia jatkuvasti, jotta mutaatioita ei pääsisi kertymään (Hanahan ja Weinberg 2011). Mutatoituneet solut voivat kuitenkin olla herkempiä mutageeneille eivätkä vahingoituttuaan välttämättä ohjautu apoptoosiin tai lopeta jakautumista, jolloin genomi on epävaka ja mutaatioita syntyy kiihtyneeseen tahtiin. Mutaatiot ovat sattumanvaraisia ja vain pieni osa niistä on soluille hyödyllisiä, mutta edullisia ominaisuuksia saavuttanut solu muodostaa jakautuessaan kilpailukykyisen populaation. Syöpäsolulle suotuisten mutaatioiden kertyminen samaan solupopulaatioon on mahdollista, kun herkästi muuntuva solu pääsee jakautumaan riittävästi (Hanahan ja Weinberg 2011).

Syöpäsoluille tyypillisiä kilpailuetuja ovat muun muassa jakautumista stimuloivan soluviestinnän ylläpitäminen, kasvun estäjien ohittaminen ja solukuoleman välttäminen (Hanahan ja Weinberg 2011). Lisäksi syöpäsolujen energiametabolia on vähemmän riippuvaista hapensaannista kuin normaaleilla soluilla, ja ilmeisesti syöpäsolut pystyvät myös välttämään tai torjumaan elimistön immuunivasteen. Kasvaimen suureneminen edellyttää solujen kykyä stimuloida verisuonten uudismuodostusta ja kasvaimen kehittyminen pahanlaatuiseksi kykyä tunkeutua ympäröiviin kudoksiin (Hanahan ja Weinberg 2011).

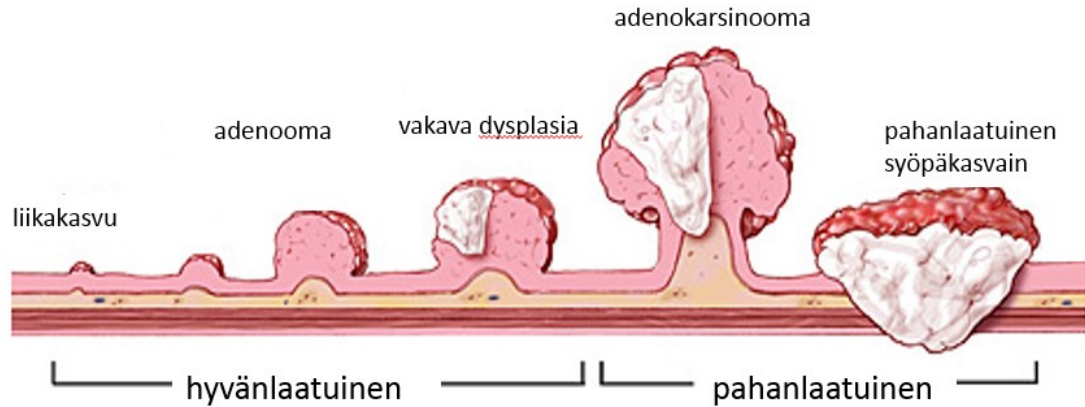
2.1.1 Paksusuolisyövän patogeneesi

Paksusuolen epiteelissä normaalisti vain suolikuopakkeiden eli kryptien pohjalla sijaitsevat kantasolut jakautuvat (kuva 1), mutta säätelyn häiriinnyttyä jakautumista

tapahtuu koko suolikuopakkeen alueella, jolloin epiteeliin muodostuu poikkeavien kryptien ryhmiä, polyyppejä, adenoomia ja lopulta karsinoomia (kuva 2) (Rafter ym. 2004). Geneettisesti syöpäalttiilla henkilöillä epiteelin jakautuminen on normaalia aktiivisempaa (Bostick ym. 1997). Nopea jakautuminen lisää mutatoitumisen riskiä ja nopeuttaa mutaatioiden yleistymistä (Rafter ym. 2004). Syöpäsolujen jakautumisen hidastaminen voi estää syövän etenemistä, mutta normaalien solujen jakautumista häiritsevä tekijä saattaa toisaalta luoda valintapainetta sopeutuvien ja vastustuskykyisten syöpäsolujen eduksi (Hanahan ja Weinberg 2011). Syöpäsolut ovat yleensä huomattavasti vähemmän erilaistuneita kuin kudoksen muut solut (Rafter ym. 2004). Solujen erilaistuminen on osa kudoksen solumäärän säätelyä, sillä erilaistuessaan solu saa kudosta ja solutyypillisiä ominaisuuksia ja lopettaa jakautumisen (kuva 1).



Kuva 1. Paksusuolen epiteelisolukon uusiutuminen. Jakautuvat solut sijaitsevat suolikuopakkeiden pohjalla. Kohti suolen lumenia siirtyessään solut erilaistuvat, lopettavat jakautumisen ja lopulta käynnistävät apoptoosin. Ulosteen nestefraktio on kiinteää ainesta todennäköisemmin kosketuksissa jakautuvien solujen kanssa (Pearson ym. 2009, Rafter ym. 1987). Kuva on mukailtu lähteestä http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS_Page.aspx?CurrentUDV=59&CMS_Page_ID=2E075D97-85A2-4CBC-A417-8379D1586907 (viitattu 12.10.2017)



Kuva 2. Paksusuolisyövän synty käynnistyy geneettisillä muutoksilla epiteelisoluissa, minkä seurauksena solut alkavat jakautua hallitsemattomasti ja muodostaa syöpää edeltäviä kasvaimia eli adenoomia (Derry ym. 2013). Muutokset solujen mikroympäristössä edistävät epiteelin adenoomien kehittymistä syöpäkasvaimiksi eli karsinoomiksi sekä syövän leviämistä ympäröiviin kudoksiin eli metastaasia. Lukuisat solusignaalireitit osallistuvat tähän prosessiin (Derry ym. 2013). Dysplasia = solujen erilaistumisen häiriö. Mukailtu lähteestä <https://fightcolorectalcancer.org/prevent/about-colorectal-cancer/> (viitattu 12.10.2017)

Solunjakautumisen vastapainona kudoksen solumäärää säätelee ohjelmoitu solukuolema eli apoptoosi, joka käynnistyy solunsisäisen tai solunulkoisen signaalin seurauksena (Elmore 2007). Normaalissa paksusuolisolukkoja sekä paksusuolisyövän kehittymisen eri vaiheissa olevia soluja vertailemalla on todettu, että paksusuolisyövän edetessä solujen kyky vastustaa apoptoosia lisääntyy (Bedi ym. 1995). Rotilla tehdyn tutkimuksen mukaan paksusuolen epiteelisolujen erilaistumisen ja apoptoosin väheneminen ennustaa kasvaimien syntyä paremmin kuin solujen lisääntynyt jakautuminen (Chang ym. 1997). Useiden ravintotekijöiden on havaittu käynnistävän apoptoosia, ja kykyä käynnistää apoptoosi syöpäsolussa pidetään suojatekijänä (Rafter ym. 2004). Normaaliin solujen lisääntynyt apoptoosi suolen epiteelissä sen sijaan johtaa korvaavaan solunjakautumiseen, mikä saattaa lisätä paksusuolisyövän kehittymisen riskiä (Rafter ym. 2004).

Sekä paksusuolisyöväälle altistavat perinnölliset mutaatiot että solussa elämän aikana syntyvät paksusuolisyöväälle ominaiset syöpämuutokset liittyvät joko syöpägeenien eli onkogeenien toiminnan tehostumiseen tai kasvunrajoite- eli tuumorisupressorigeenien toiminnan heikkenemiseen (Fearon ym. 2011). Yksi tyypillisimmistä on nk. *APC*-geenin (engl. *adenomaous polyposis coli gene*) inaktivoituminen, joka johtaa useiden onkogeenien transkriptiota lisäävän β -kateniinin kertymiseen solujen sytosoliin ja sitä kautta edelleen tumaan. Tämän signaalireitin toimintaa voivat häiritä myös lukuisat muut

mutaatioita. *APC* -geenin tuottama proteiini säätelee normaalisti muun muassa soluliitoksia, apoptoosia, solun migraatiota ja kromosomien erkanemista tytärsoluihin. *APC*-geenin mutaatio löytyy usein jo paksusuolisyövän varhaisvaiheessa, minkä vuoksi sen ajatellaan olevan yksi tärkeimmistä syöpäprosessin käynnistymiseen eli initiaatioon johtavista mutaatioista. Toinen paksusuolisyöpäsoluissa tyypillisesti mutatoitunut geeni on *P53*-geeni. Sitä ei kuitenkaan löydy useimmista adenoomista, ja siksi sen ajatellaan liittyvän adenooman etenemiseen karsinoomaksi. *P53*-geeni koodaa solusyklin tarkistuspisteissä tarvittavia proteiineja, ja häiriö sen toiminnassa voi johtaa solukierron jatkumiseen solun vaurioitumisesta tai epäsuotuisista olosuhteista huolimatta. Tällainen mutaatio antaa solulle kilpailuedun kasvainsolukon haastavissa olosuhteissa, joissa toimiva *P53*-geeni pysäyttää solusyklin tai käynnistää apoptoosin (Fearon ym 2011).

Syöpämuutosten kehittyminen alkaa mahdollisesti kroonisesta matala-asteisesta tulehduksesta eli inflammatiosta (Derry ym. 2013). Normaalisti tulehdusreaktiota seuraa tulehdusta hillitsevän viestinnän aktivoituminen, mutta tulehdusreaktio saattaa jäädä päälle, jos tulehduksen aiheuttaja ei poistu tai jos säätely on häiriintynyt. Inflammatation seurauksena solut kärsivät hapetusstressistä, mikä vahingoittaa solujen DNA:ta ja häiritsee sen korjausta. Tulehtuneen kudoksen solut tuottavat tulehdusvälittäjäaineita, jotka houkuttelevat kudokseen tulehdussoluja ja osallistuvat kasvuhormonien ja -tekijöiden kuten insuliinin kaltaisen kasvutekijä-1:n ja verisuonen endoteelin kasvutekijän säätelyyn. Nämä puolestaan osallistuvat kasvainsolujen jakautumiseen ja metastaasiin (Derry ym. 2013).

2.1.2 Paksusuolisyöpä ja suolen lumenin olosuhteet

Paksusuoli altistuu jatkuvasti suolen ontelon eli lumenin yhdisteille, jotka ovat peräisin ravinnosta, isännän elimistöstä tai suolistomikrobien aineenvaihdunnasta. Osa yhdisteistä on mahdollisesti syöpää aiheuttavia tai edistäviä, kuten sappihapot, nitrosoyhdisteet sekä heterosykliset amiinit (Pearson ym. 2009). Jotkin yhdisteet, kuten lyhytketjuiset rasvahapot sekä fenoliset yhdisteet, saattavat puolestaan suojata syövältä (Pearson ym. 2009).

Paksusuolen mikrobisto

Ihmisen ruoansulatuskanavan mikrobisto, joka koostuu lukuisista bakteereista, eukaryooteista, metanogeenisistä arkeista sekä viruksia, on jatkuvasti vuorovaikutuksessa ravintoperäisten yhdisteiden kanssa tuottaen niistä erilaisia aineenvaihduntatuotteita eli metaboliitteja (Valdés ym. 2015). Mikrobiston koostumus on yksilöllinen ja osittain pysyvä, mutta se myös muuttuu jatkuvasti esimerkiksi ruokavalion muutoksien tai antibioottien vaikutuksesta (Valdés ym. 2015). Suolistomikrobit voivat ehkäistä paksusuolisyöpää, mutta mikrobiston epätasapaino eli dysbioosi voi edistää sen kehittymistä (Núñez-Sánchez ym. 2015). Mikrobiston koostumuksen ja paksusuolisyövän yhteyttä on tutkittu jonkin verran. Paksusuolisyöpäpotilaiden suoliston mikrobisto poikkeaa terveiden ihmisten mikrobistosta, mutta muutoksia syntyy myös sairauden edetessä (Núñez-Sánchez ym. 2015). Toistaiseksi on epäselvää, mitkä mikrobiston muutokset voivat myötävaikuttaa paksusuolisyövän kehittymiseen, ja mitkä syntyvät sen seurauksena. Kasvaimen mikrobisto myös poikkeaa saman henkilön terveeseen paksusuolikuudoksen mikrobistosta (Burns ym. 2015). Paksusuolisyövän kokeellisella hiirimallilla tehdyssä kokeessa paksusuolisyöpäpotilaiden uloste annosteltuna hiirien mahaan kahdesti viikossa lisäsi muun muassa polyyppeiden muodostumista ja inflammaatiota verrattuna hiiriin, jotka saivat terveiden henkilöiden ulostetta (Wong ym. 2017). Paksusuolisyövälle tyypillistä mikrobiston koostumusta ei tunneta, mutta mikrobiston muokkausta paksusuolisyövän ennaltaehkäisyssä ja hoidossa tutkitaan (Núñez-Sánchez ym. 2015). Prebioottien ja probioottien yhdistelmällä on esimerkiksi pystytty vaikuttamaan erilaisiin riskiä kuvaaviin biomarkkereihin paksusuolisyöpä- ja polyypipotilailla (Rafter ym. 2007).

Ulosteen kemiallinen koostumus

Paksusuolisyövälle altistavia ulosteen ominaisuuksia on etsitty vertailemalla paksusuolisyöpäpotilaiden ja terveiden verrokkien ulostenäytteitä. Vertailevissa tutkimuksissa havaitut erot eivät kuitenkaan välttämättä ole sairauden riskitekijöitä, vaan voivat olla seurausta sairauden aiheuttamista muutoksista.

Paksusuolisyöpäpotilaiden ulosteen sappihappojen (deoksikoolihappo ja litokoolihappo) pitoisuudet olivat yhdessä tutkimuksessa suurempia kuin terveillä tutkittavilla (Stadler ym. 1988). Toisessa tutkimuksessa suuren riskin potilaiden, joilla oli yksi tai useampi

halkaisijaltaan yli 1 cm adenooma, ulosteen sappihappojen pitoisuus ei eronnut verrokkien vastaavasta (De Kok ym. 1999).

Sairastuneiden ulostevedestä mitattiin merkitsevästi pienempiä pitoisuuksia lyhytketjuisia rasvahappoja kuin terveiden henkilöiden näytteistä (Monleón ym. 2009, Ohigashi ym. 2013). Adenoomapotilailla lyhytketjuisten rasvahappojen pitoisuudet olivat potilaiden ja terveiden henkilöiden vastaavien väliltä (Ohigashi ym. 2013). Lyhytketjuisia rasvahappoja muodostuu paksusuolella hiilihydraattien fermentoitessa, ja niiden pitoisuuden ulosteessa on myös havaittu olevan kääntäen yhteydessä polyypipotilaiden paksusuolen epiteelin jakautumisaktiivisuuteen (Dolara ym. 2002).

Suuren riskin potilailla ulostevesi oli yhdessä tutkimuksessa happamampaa kuin terveillä henkilöillä (De Kok ym. 1999), mutta viimeisimmässä vertailevassa tutkimuksessa paksusuolisyöpäpotilaiden ulosteen pH oli sitä vastoin merkitsevästi korkeampi kuin terveillä henkilöillä (Ohigashi ym. 2013). Adenoomapotilailla ulosteen happamuus oli tässä tutkimuksessa potilaiden ja terveiden henkilöiden väliltä (Ohigashi ym. 2013).

Leusiinin, proliinin ja kysteiinin pitoisuudet olivat yhdessä tutkimuksessa merkitsevästi suurempia potilailla kuin verrokeilla, mahdollisesti musiinien eli limakalvon proteiinien muutosten seurauksena (Monleón ym. 2009).

Ulosteveden vaikutus paksusuolisyöpäsolujen jakautumiseen ja apoptoosiin

Ulosteveden vaikutuksia paksusuolisyövän kehittymisen eri vaiheissa on tutkittu solumallien avulla. Ulostevedessä on muun muassa apoptoosia aiheuttavia yhdisteitä, ja syöpäsolut saattavat olla herkempiä tälle vaikutukselle kuin terveet epiteelisolut (Haza ym. 2000).

Haza kollegoineen (2000) vertasi terveiltä henkilöiltä kerättyjen ulostevesinäytteiden vaikutusta HT-29 -adenokarsinoomasolujen ja sikiön paksusuolisolujen (FHC) apoptoosiin. Lisäksi tutkimuksessa verrattiin sappihappojen, natriumbutyraatin sekä fraktioimattomien ulostevesinäytteiden ja niiden rasvaosan vaikutusta. Kaikki tutkitut altisteet aiheuttivat apoptoosia molemmissa solulinjoissa, mutta FHC -solut olivat kaikille vähemmän herkkiä kuin HT-29 -solut. Ulostevesinäytteet sellaisenaan olivat tehokkaampia kuin niistä eristetyt rasvaliukoiset komponentit, minkä perusteella havaittu vaikutus apoptoosiin ei johtunut yksinomaan ulosteveden rasvaliukoisista yhdisteistä,

kuten sappihapoista. Ulosteveden kyky aiheuttaa apoptoosia oli kääntäen yhteydessä pH-arvoon, mutta ei sytotoksisuuteen (Haza ym. 2000).

Ulosteveden rasvaliukoiset yhdisteet voivat lisätä epiteelisolujen jakautumista. Adenoomapotilaiden ulosteveden rasvaliukoiset yhdisteet lisäsivät HCT-116 -solujen jakautumista merkitsevästi enemmän kuin terveiden henkilöiden vastaavat näytteet (Nordling ym. 2003). Tässä tutkimuksessa fraktioimattomien ulostevesinäytteiden mahdollisia vaikutuksia ei tutkittu.

Ulostevedessä voi siis olla sekä apoptoosia käynnistäviä että solujen jakautumiseen vaikuttavia yhdisteitä, ja ainakin apoptoosia aiheuttavat tekijät saattavat myös vaikuttaa tehokkaammin kasvainsoluihin kuin normaaleihin paksusuolisoluihin (Haza ym. 2000, Nordling ym. 2003). Osa apoptoosia lisäävistä tekijöistä on vesiliukoisia ja mahdollisesti myös ulosteveden happamuutta lisääviä (Haza ym. 2000). Tällaisia suolessa vaikuttavia yhdisteitä voivat olla ravintoperäiset polyfenolit, sekä niiden hajotuksessa muodostuvat ja suolistossa runsaana esiintyvät metaboliitit, kuten fenoliset hapot (Russel ja Duthie 2011).

2.2 Marjojen polyfenolit ja paksusuolisyöpä

Useiden marjoissa esiintyvien polyfenolien on todettu säätelevän syövän syntyyn ja etenemiseen osallistuvia solutoimintoja soluviljelmissä (Afrin ym. 2016). Ravinnon polyfenolit imeytyvät kuitenkin heikosti ruoansulatuskanavasta sellaisenaan, ja merkittävä osa kulkeutuu paksusuoleen, jossa mikrobit pilkkovat ne pienemmiksi yhdisteiksi (Tomás-Barberán ym. 2016). Polyfenolien aineenvaihdunta on yksilöllistä, ja muodostuvien metaboliittien kirjo riippuu myös suoliston mikrobiston yksilöllisestä koostumuksesta. Vaikutus on kaksisuuntainen, sillä paksusuoleen päätyvä aines puolestaan muokkaa mikrobistoa. Myös useat polyfenoleista suolistossa muodostuvat metaboliitit säätelevät syöpäsolujen kasvua soluviljelmissä (Roy ym. 2016).

Tässä tutkielmassa yksittäisten polyfenolien erilliset vaikutukset eivät olleet kiinnostuksen kohteena. Tässä osiossa keskitytään vain kokonaisilla marjoilla, marjoista uutetuilla polyfenolien luonnollisilla seoksilla sekä fermentoiduilla marjoilla tai marjauutteilla saatuun tutkimusnäyttöön. Ihmisillä ja eläimillä tehdyissä tutkimuksissa

vasteena ovat kasvainten muodostumista ja kasvua kuvaavat muuttujat, solututkimuksissa puolestaan solujen jakautumisaktiivisuutta ja / tai apoptoosia kuvaavat muuttujat.

Kasviravinnossa tiedetään esiintyvän ainakin 8000 erilaista polyfenolia (Williamson ja Clifford 2010). Ravinnossa on myös ruoka-aineiden prosessoinnissa muodostuvia polyfenolien johdannaisia, joita kasveissa ei luonnostaan esiinny (Crozier ym. 2009). Polyfenolien monimuotoisuuden mahdollistavat kemiallinen rakenne, stereoisomeria, hapetusaste, hydroksyyliyhymien määrä ja asema, sekä konjugoituminen polymeereihin ja sokereihin (Afrin ym. 2016). Fenoliset hapot ovat polyfenoleista pienimpiä, kun taas esimerkiksi tanniinit voivat olla hyvinkin suuria ja monimutkaisia molekyyliä (Ramos ym. 2008). Fenolisia happoja vapautuu runsaasti paksusuolella suolistomikrobien pilkkouessa monimutkaisempia ja heikosti imeytyviä polyfenoleja (Russel ja Duthie 2011).

Tässä tutkielmassa keskitytään marjojen polyfenolien mahdollisiin paksusuolisyöpää ehkäiseviin vaikutuksiin. Marjojen muilla ainesosilla voi lisäksi olla lukuisia paksusuolisyövältä mahdollisesti suojaavia vaikutuksia, jotka jäävät tämän rajauksen ulkopuolelle.

2.2.1 Marjat polyfenolien lähteenä suomalaisilla

Ruoka-aineen merkitys polyfenolien lähteenä riippuu polyfenolipitoisuuden lisäksi käyttömääristä ja -tiheydestä. Länsimaissa merkittävimpiä lähteitä ovat kahvi, tee ja suklaa (Crozier ym. 2009). Esimerkiksi niin kutsutussa Välimeren ruokavaliossa on runsaammin myös muita hyviä polyfenolien lähteitä, kuten kasviksia ja hedelmiä, pähkinöitä ja palkokasveja (Valdés ym. 2015). Marjat sisältävät erityisen runsaasti polyfenoleja. Suomalaisilla tehdyssä tutkimuksessa ravinnon 20 rikkaimmasta polyfenolien lähteestä peräti 16 oli marjoja (Ovaskainen ym. 2008).

Marjojen polyfenolien pitoisuuksiin ja monimuotoisuuteen vaikuttavat kasvin laji ja lajike, toisin sanoen kasvin geneettiset ominaisuudet, mutta myös ympäristötekijät kuten sääolosuhteet, valon määrä, ravinteet, kypsyysaste ja sadonkorjuu-aika, sekä varastointi ja erilaiset käsittelyt (Afrin ym. 2016). Esimerkiksi mustikan kasvuolosuhteiden vaihtelevuus voi tuottaa moninkertaisia eroja eri alueilta kerättyjen mustikoiden polyfenolipitoisuuksiin (Mikulic-Petkovsek ym. 2015). KarniMari-interventiossa tutkimusruokavalioon sisältyi suomalaista mansikkaa, mustikkaa, puolukkaa, lakkaa,

vadelmaa ja mustaherukkaa, joten näiden marjojen polyfenolikoostumus esitellään tässä tarkemmin.

Mansikka, vadelma ja lakka kuuluvat ruusukasvien heimoon (*Rosaceae*). Niiden polyfenoleista suurin osa on ellagitanniineja (Määttä-Riihinen ym. 2004 b, Koponen ym. 2007). Suomalaisissa marjoissa ellagihappopitoisuus tuorepainoa kohti on mansikassa 650-850 mg/kg, viljellyssä vadelmassa 1900 mg/kg, villissä vadelmassa 2600-3300 mg/kg ja lakassa 3600 mg/kg. Antosyaaneja on mitattu merkittäviä määriä vadelmasta (400-890 mg/kg) ja mansikasta (315-360 mg/kg), lakasta sen sijaan vain hyvin pieniä määriä (20 mg/kg) ja keltaisesta vadelmasta ei lainkaan. Vadelmassa antosyaanit ovat pääasiassa syanidiineja ja mansikassa pelargonidiineja. Kaikissa kolmessa marjassa on myös hydroksikanelihappoja sisältäviä yhdisteitä (Määttä-Riihinen ym. 2004b). Mansikassa on lisäksi muun muassa gallushapon estereitä ja lakassa vapaata gallushappoa. Flavonolien, flavan-3-olien ja proantosyanidiinien määrät ovat suomalaisissa mansikoissa, vadelmissa ja lakoissa pieniä (Määttä-Riihinen ym. 2004b).

Mustikka ja puolukka kuuluvat kanervakasvien heimon (*Ericaceae*) *Vaccinium*-sukuun. Molempien marjojen polyfenoleista valtaosa on antosyaaneja (Koponen ym. 2007, Määttä-Riihinen ym. 2004a). Puolukassa antosyaanien pitoisuus on pienempi, mutta proantosyanidiinien pitoisuus erityisen suuri. Suomalaisten mustikoiden antosyaanipitoisuudeksi on mitattu 5100-8000 mg/kg. Yli puolet näistä yhdisteistä on delfinidiineja ja syanidiineja, mutta myös petunidiineja, peonidiineja ja malvinidiineja on runsaasti. Puolukan antosyaanit ovat lähes ainoastaan syanidiineja ja kokonaispitoisuudeksi on mitattu noin 770-1300 mg/kg (Koponen ym. 2007, Määttä-Riihinen 2004 a). Proantosyanidiineja on puolukassa arviolta 1000 mg/kg, mustikassa ei juuri lainkaan. Flavonoleja on mitattu mustikasta yli 100 mg/kg ja puolukasta yli 150 mg/kg, flavan-3-oleja vastaavasti 75 mg/kg ja 255 mg/kg. Hydroksikanelihappojen konjugaatteja esiintyy molemmissa runsaasti. Ellagitanniineja näissä marjoissa ei esiinny lainkaan (Koponen ym. 2007).

Mustaherukka kuuluu herukkakasvien heimoon (*Grossulariaceae*), ja kuten mustikalla, marjan tumma väri johtuu suuresta antosyaanipitoisuudesta. Delfinidiineja, syanidiineja ja tunnistamattomia antosyaaneja on mitattu suomalaisista mustaherukoista 2000-4100 mg/kg (Koponen ym. 2007, Määttä-Riihinen ym. 2004a). Flavonolien pitoisuus on samaa luokkaa kuin puolukassa, 155 mg/kg (Määttä-Riihinen ym. 2004a). Proantosyanidiinien

pitoisuus on niin ikään verrattain suuri, mutta kuitenkin pienempi kuin puolukassa, arviolta 100 mg/kg. Ellagitanniineja ei mustaherukassa esiinny (Koponen ym. 2007, Määttä-Riihinen ym. 2004a). Kuten kaikissa mainituissa marjoissa, myös mustaherukassa on merkittäviä määriä hydroksikanelihappoja (Koponen ym. 2007, Määttä-Riihinen ym. 2004a).

2.2.2 Marjojen polyfenolien aineenvaihdunta ruoansulatuskanavassa

Ihmisen elimistö käsittelee ja erittää ravinnon polyfenoleja vierasaineina (Crozier ym. 2009). Ennen imeytymistä polyfenolien täytyy vapautua niitä ympäröivästä ruoka-aineesta (Valdés ym. 2015). Kasvisoluseinät hajoavat pureskelun, ihmisen ruoansulatusentsyymien sekä mikrobien entsyymien avulla. Ruoka-aineiden prosessointi saattaa muuttaa polyfenolien hyödynnettävyyttä. Myös aterian muut yhdisteet voivat esimerkiksi saostaa polyfenoleja imeytymättömään muotoon (Valdés ym. 2015). Rasvat näyttäisivät lisäävän polyfenolien hyödynnettävyyttä, kuitu puolestaan heikentävän sitä (Valdés ym. 2015).

Ylempi ruoansulatuskanava

Hyvin pieni osa polyfenoleista imeytyy jo mahan tai ohutsuolen alueella sellaisenaan (Matsumoto ym. 2001), mutta glukoosiin sitoutuneiden polyfenolien imeytyminen voi olla runsaampaa (Auger ym. 2008). Tähän uskotaan olevan ainakin kaksi mahdollista reittiä; entsyymaattinen hydrolyysi suolessa ohutsuolen epiteelin pinnalla ja vapautuneen aglykonin pääsy soluun passiivisella diffuusiolla lisääntyneen rasvaliukoisuuden ja epiteelikontaktin ansiosta, tai vaihtoehtoisesti sokerikonjugaatin pääsy soluun aktiivisesti glukoosikuljettimen kautta ja entsyymaattinen hydrolyysi vasta solun sisällä (Crozier ym. 2009). Ilmeisesti ainakaan flavonoidit eivät kuitenkaan pääse soluun glukoosikuljettimien kautta, vaan sitä vastoin estävät niiden toimintaa (Kottra ym. 2007).

Epiteelisolussa aglykoneihin liitetään sulfaatti-, metyyli- ja glukuronidiryhmiä (Crozier ym. 2009), minkä jälkeen osa näistä kuljetetaan suoraan takaisin suolen onteloon. Verenkiertoon imeytyneet metaboliitit kulkeutuvat maksaan muokattaviksi ja maksasta ne jatkavat systeemiseen verenkiertoon. Osa tuotteista päätyy maksasta takaisin suoleen enterohepaattisen kierron kautta. Verenkiertoon päässeet yhdisteet muokkautuvat myös munuaisissa ja osa erittyy virtsaan (Giampieri ym. 2014).

Antosyaaneista alle 1 % imeytyy ja erittyy virtsaan alkuperäisessä muodossaan, mutta runsas pitkäaikainen saanti voi kuitenkin aiheuttaa lievää kertymistä elimistöön (Stoner ym. 2005). Osa imeytymättömistä antosyaaneista hajoaa jo ohutsuolessa, mutta antosyaanin rakenteesta riippuen jopa 85 % voi kulkeutua sellaisenaan paksusuoleen (Kahle ym. 2006). Bentsoehapon johdannaiset näyttäisivät imeytyvän ainakin osin jo ohutsuolessa (Russel ym. 2009). Terveillä vapaaehtoisilla tehdyssä kokeessa mansikan bentsoehapoista noin 30 % erittyi virtsaan viiden tunnin kuluessa mansikka-annoksen nauttimisesta, mutta kanelihappoja ei tässä ajassa erittynyt juuri lainkaan (Russel ym. 2009). Vapaassa muodossa esiintyvät kanelihapot voivat kuitenkin imeytyä jo mahasta ja ohutsuolessa (Pei ym. 2015). Vihreällä teellä tehdyn tutkimuksen perusteella flavan-3-olien imeytyminen ohutsuolessa on muita polyfenoleja tehokkaampaa, sillä arviolta vain 40 % annoksesta kulkeutui ohutsuolessa paksusuoleen, vaikka ne ovat stabiileja ylemmässä ruoansulatuskanavassa (Auger ym. 2008). Ellagitanniinit voivat hydrolysoitua jejunumissa ellagihapoksi ja imeytyä (Giampieri ym. 2014). Enterosyyteissä muodostuvat ellagihapon metaboliitit kulkeutuvat maksaan ja muodostavat siellä yhdisteitä, jotka erittyvät nopeasti virtsaan systeemisestä verenkierrosta (Giampieri ym. 2014).

Paksusuoli ja mikrobimetabolia

Mikrobien ja ihmisen aineenvaihdunnan yhdessä tuottamat polyfenolimetaboliitit muodostuvat useita tunteja ruokailun jälkeen (Dall'Asta ym. 2012). Suoliston mikrobit kykenevät paitsi vapauttamaan sitoutuneita fenolisia happoja, myös muokkaamaan niitä toisiksi yhdisteiksi, joista osa kuitenkin säilyttää fenolisen rakenteensa (Williamson ja Clifford 2010). Mikrobiston ja polyfenolien vuorovaikutus on kaksisuuntainen; mikrobit vaikuttavat aineenvaihduntatuotteiden muodostumiseen ja imeytymiseen, mutta samalla polyfenolit suosivat joitakin mikrobeja ja rajoittavat toisia (Valdés ym. 2015). Näin ollen mikrobiston yksilöllinen koostumus vaikuttaa ravinnon polyfenolien aineenvaihduntaan, polyfenolit puolestaan muokkaavat mikrobistoa ja sitä kautta vaikuttavat edelleen ravinnosta muodostuviin aineenvaihduntatuotteisiin (Valdés ym. 2015.) Fenolisen yhdisteen lopulliset aineenvaihduntatuotteet riippuvat mikrobiston koostumuksesta ja ravinnon muista yhdisteistä, joiden hajotusreitit risteävät ja vaikuttavat toisiinsa (Russel ja Duthie 2011). Suolistossa muodostuvia metaboliitteja on siten mahdotonta tarkasti ennustaa syötyjen ruoka-aineiden perusteella.

Mikrobientsyymeistä ja niiden toiminnasta tiedetään toistaiseksi melko vähän. Mikrobit voivat muokata polyfenoleja entsyymaattisesti pilkkomalla niiden glykosidi-, ester- ja amidisidoksia (Williamson ja Clifford 2010). Entsyymit kykenevät myös irrottamaan glukuronidin isännän vierasaineenvaihdunnan muodostamista tuotteista. Näin muodostuneita aglykoneja mikrobit muokkaavat lukuisin eri tavoin, kuten dehydroksylaatiolla, demetoksilaatiolla, demetylaatiolla, dehydrogenaatiolla, sekä aromaattisen renkaan hajotustuotteiden alfa- ja beta-oksidaatiolla. Polyfenolien hajotuksessa irtoaa muun muassa oksaloasetattia, joka puolestaan hajoaa lopulta hiilidioksidiksi (Williamson ja Clifford 2010).

Suuri osa ravinnon polyfenoleista päätyy joko muokattuina tai sellaisenaan paksusuoleen, missä mikrobit tuottavat niistä etenkin fenolisia happoja (Crozier ym. 2009). Näiden metaboliittien imeytyminen ja erittyminen virtsaan voi olla ravinnon alkuperäisiin polyfenoleihin verrattuna huomattavaa. Esimerkiksi räässä ihmisillä tehdyssä kokeessa plasman korkein protokatekiinihapon pitoisuus oli 250-kertainen syödyn antosyaanin (syanidiini-3-O-glykosidi) suurimpaan pitoisuuteen verrattuna (Vitaglione ym. 2007). Yhdestä polyfenolista voi myös muodostua kymmeniä erilaisia metaboliitteja (Crozier ym. 2009). Myös paksusuolesta imeytyneet metaboliitit kulkeutuvat ensin maksaan muokattavaksi, minkä jälkeen ne joko palaavat suoleen sappinesteen mukana tai jatkavat systeemiseen verenkiertoon (Giampieri ym. 2014).

Valtaosa ravinnon kanelihapoista on konjugoituneena toisiin molekyyleihin ja vapautuu vasta paksusuolella useita tunteja aterian jälkeen (Russel ym. 2009, Williamson ja Clifford 2010). Virtsasta ja plasmasta löytyvät hajotustuotteet ovat pääasiallisesti dihydrokanelihappoja (Williamson ja Clifford 2010).

Proantosyanidiinit kulkeutuvat muokkautumatta paksusuoleen, jossa mikrobit tuottavat niistä laajan joukon erilaisia virtsan mukana erittyviä fenolisia happoja (Giampieri ym. 2014).

Vaikka ellagitanniinit imeytyvät osittain jo ohutsuolessa, muuttavat mikrobit suolistossa suuren osan ellagitanniineista urolitiineiksi, jotka imeytyvät paksusuolesta rasvaliukoisuuden lisääntyessä (Giampieri ym. 2014). Ihmisen vierasaineenvaihdunta tuottaa näistä joukon johdannaisia, joista osaa löytyy plasmasta ja osaa virtsasta. Mikrobiston koostumus vaikuttaa suuresti urolitiinien muodostumiseen ja niiden tuotto onkin hyvin yksilöllistä (Giampieri ym. 2014).

Paksusuoleen kulkeutuvien antosyaanien mahdollisia metaboliitteja on tutkittu melko paljon, erityisesti keinotekoisilla suolistomikrobistoilla *in vitro* (Aura ym. 2005, Fleschhut ym. 2006, Keppler ym. 2005, Correa-Betanzo ym. 2014). Sikojen umpisuolen mikrobeilla pääasiallisia metaboliitteja olivat protokatekiinihappo, syringiinihappo, vanilliinihappo ja floroglusinaldehydi (Keppler ym. 2005). Ihmisen suolistomikrobeilla tehdyssä kokeessa asetyyli- ja glykosidiryhmiä sisältäneet antosyaanit hajosivat fermentaation aikana päätuotteenaan antosyaanin rakenteesta riippuen joko protokatekiinihappo, syringiinihappo tai vanilliinihappo (Fleschhut ym. 2006). Syanidiinipohjaisista antosyaaneista mikrobit tuottivat protokatekiinihappoa ja pelargodiniinipohjaisista 4-hydroksibentsoehappoa. Asetyyliryhmiä sisältävät antosyaanit hajosivat välituotteiden kautta pääasiallisesti 4-hydroksibentsoehapoksi, p-kumariinihapoksi, ferulahapoksi ja kahvihapoksi. Muitakin hajotusreittejä kuitenkin on, sillä fenolisten happojen muodostuminen selittää vain osan antosyaanien katoamisesta (62 %, Fleschhut ym. 2006). Suolistossa vapautuneet aglykonit voivat myös muodostaa muiden ryhmien kanssa uusia konjugaatteja (Aura ym. 2005).

Marjojen polyfenolien suolistometaboliitit ihmisellä

Marjojen polyfenolien seoksista *in vivo* muodostuvia metaboliitteja on toistaiseksi tutkittu melko vähän. Useimmissa tutkimuksissa paksusuoleessa syntyviä imeytyviä metaboliitteja on tunnistettu verestä tai virtsasta sen perusteella, että ne ilmaantuvat vasta tunteja polyfenolien nauttimisesta. Metaboliittien kirjo näyttää vaihtelevan yksilöllisesti (Gill ym. 2010, Truchado ym. 2011, Cerdá ym. 2005).

Marjojen gallushappoa ja kahvihappoa näyttäisi imeytyvän jo ruoansulatuskanavan alkupäässä, sillä pitoisuudet ovat korkeimmillaan 1-2 tuntia marjojen nauttimisesta (Pimpão ym. 2015). Merkittävä osa protokatekiinihaposta vapautuu ilmeisesti vasta paksusuoleessa, sillä plasman pitoisuudet alkavat suurentua vasta useita tunteja aterian jälkeen ja ovat mitattavissa paastoverinäytteestä vielä seuraavana päivänä (Koli ym. 2010, Pimpão ym. 2014). Protokatekiinihappo on yleinen antosyaanipitoisista marjoista muodostuva metaboliitti, jota on marjojen syönnin jälkeen löydetty sekä plasmasta, virtsasta että ulostevedestä (Gill ym. 2010, Koli ym. 2010, Pimpão ym. 2014). Pitkäaikainen marjojen päivittäinen nauttiminen voi lisätä protokatekiinihapon lisäksi ainakin kversetiinin, kahvihapon, p-kumariinihapon ja vanilliinihapon pitoisuuksia paastoveressä sekä kversetiinin, p-kumariinihapon ja dihydroksifenyylietikkahapon

erittymistä virtsaan (Koli ym. 2010). Ellagitanniineista ja ellagihaposta paksusuolen mikrobit tuottavat erilaisia urolitiineja, joiden muodostuminen on hyvin yksilöllistä ja joiden erittyminen virtsaan jatkuu useiden vuorokausien ajan (Cerdá ym. 2005, Truchado ym. 2011, Correa-Betanzo ym. 2014).

Marjojen polyfenolien suolistometaboliaa ihmisellä on tutkittu myös *in vitro*, mutta polyfenolien aineenvaihdunta on todellisuudessa monimutkaisempaa kuin mitä kemiallisella ja mikrobiologisella käsittelyllä on mahdollista mallintaa. Ruoansulatuksen *in vitro* -simulaation avulla on kuitenkin voitu vertailla ruoansulatuksen eri vaiheita. Esimerkiksi pensasmustikan polyfenoleista 94 % ja antosyaaneista 97 % säilyi muuttumattomana mahan simulaatiossa (Correa-Betanzo ym. 2014). Ohutsuolen simulaatiosta selvisi vastaavasti 49 % ja 17 %, ja mikrobikäsittelyn jälkeen jäljellä oli enää 42 % ja 1,5 %. Fermentaation myötä runsas erilaisten polyfenolien valikoima vaihtui rajalliseen määrään fenolisia happoja. Antosyaanien asetyyyliglukosidit olivat kuitenkin poikkeuksellisen kestäviä ja niitä oli jäljellä vielä fermentaationkin jälkeen. Fenolien kokonaispitoisuus säilyi, mutta seoksen kemiallinen antioksidatiokyky väheni puoleen ruoansulatuksen jälkeen ja olemattomiin fermentaation jälkeen (Correa-Betanzo ym. 2014). Myös muiden *in vitro* -tutkimusten perusteella marjojen polyfenolit muokkautuvat ruoansulatuskanavassa fenolisiksi metaboliiteiksi, jotka todennäköisesti selittävät osan polyfenolien bioaktiivisuudesta (Coates ym. 2007, Brown ym. 2012, Brown ym. 2014, Dall'Asta ym. 2012).

2.2.3 Kokeelliset marjatutkimukset paksusuolisyöpäpotilailla

Marjojen vaikutusta paksusuolisyöpäpotilainen kasvainten kasvuun on toistaiseksi tutkittu vain suurilla annoksilla jauhettua pakkaskuivattua mustavadelmaa (Wang ym. 2011, Mentor-Marcel ym. 2012, Wang ym. 2014) tai standardoitua antosyaanipitoista mustikkauutetta (Mirtosyan, Thomasset ym. 2009).

Thomasset (2009) tutkimusryhmineen tutki mustikkauutteen (Mirtosyan) vaikutusta paksusuolisyöpäpotilaiden kudosten antosyaanipitoisuuksiin sekä kasvaimista ja kasvaimia ympäröivästä normaalista kudoksesta otettujen solujen jakautumisaktiivisuuteen. Tutkittavat (n=15) saivat mustikkauutetta seitsemän päivän ajan ennen heille varattua leikkausaikaa jollakin kolmesta eri annoksesta, 1,4 g / 2,8 g / 5,6 g, joista pienimmän päiväannoksen antosyaanipitoisuus vastasi noin 370 g tuoreita

mustikoita. Potilailta otettiin kudospäilyte syöpäkasvaimesta diagnosoinnin yhteydessä ennen interventiotutkimusta, ja seitsemän päivää kestäneen intervention jälkeen leikkauksen yhteydessä otettiin uusi kasvainnäyte. Kudospäilytteistä määritettiin solujen jakautumisaktiivisuus Ki-67-proteiinin värjäytymiseen perustuvalla menetelmällä ja apoptoottisten solujen osuus kaspasi-3:n värjäytymiseen perustuvalla menetelmällä. Intervention lopuksi kerättyjen kasvainsolujen jakautumisaktiivisuus oli 7 % pienempi kuin ennen interventiota kerätyissä näytteissä, mutta kuitenkin vain pienimpiä mustikkauuteannoksia saaneilla potilailla muutos oli tilastollisesti merkitsevä. Apoptoottisten solujen osuus nousi 3,6 prosentista 5,3 prosenttiin, mutta tulos saattoi johtua kasvaimien kirurgiseen poistoon liittyneestä solukuolleisuudesta. Antosyaaneja ja niiden metyyli- ja glukuronidimetaboliitteja löytyi tutkittavien virtsasta, plasmasta ja paksusuolikudoksesta (Thomasset ym. 2009)

Pakkaskuivatun mustavadelman suurilla annoksilla on niin ikään saatu aikaan lupaavia, mutta toistaiseksi melko vaatimattomia suojavaikutuksia paksusuolisyyöpäpotilailla. Wang tutkimusryhmineen tutki normaalin paksusuolikudoksen sekä kasvainkudoksen jakautumisaktiivisuuteen ja apoptoosiin liittyvän geeniekspression muutoksia 1-9 viikon mittaisen mustavadelmasupplementaation jälkeen (Wang ym. 2011). Päivittäinen marjajauheen annos oli 60 g, mikä vastaa noin 600 g tuoretta mustavadelmaa. Kaikilla 20 potilaalla syöpäsolujen jakautumisaktiivisuutta kuvaavien proteiinien ilmentyminen väheni, ja apoptoosia kuvaavan proteiinin ilmentyminen lisääntyi lähtötilanteeseen verrattuna. Kun potilaat jaettiin kahteen ryhmään suplementaation keston mukaan (keskimäärin noin neljä viikkoa tai keskimäärin noin kaksi viikkoa), havaittiin pidemmän jakson johtaneen merkitsevästi suurempiin muutoksiin edellä mainittujen proteiinien ilmentymisessä (Wang ym. 2011). Osa näistä muutoksista oli myös yhteydessä potilaiden plasman tulehdustekijöihin (Mentor-Marcel ym. 2012).

Toisessa tutkimuksessa tutkittiin pakkaskuivatun mustavadelman tehoa familiaalista adenomatoottista polypoosia (FAP) sairastavien potilaiden peräsuolen polyyppisiin sekä jauheen että peräpuikkojen muodossa (Wang ym. 2014). FAP on perinnöllinen paksusuolisyyövän muoto, jonka hoitoon kuuluu aina paksusuolen poisto sekä polyyppien säännöllinen poisto peräsuolesta koko elämän ajan. Tässä tutkimuksessa 14 FAP-potilasta käytti yhdeksän kuukauden ajan yöksi peräsuoleen asetettavia mustavadelmavalmistetta, sekä joko suun kautta otettavaa mustavadelmajauhetta (60 g/pv) tai lumevalmistetta. Kaikkia potilaita tarkasteltaessa polyyppien lukumäärän ja koon perusteella laskettu

polyyppikuorma oli intervention jälkeen merkitsevästi pienempi kuin lähtötilanteessa, mutta suun kautta otetulla mustavadelmalla ei ollut merkitsevää lisävaikutusta lumevalmisteseeseen verrattuna. Vain kolmella potilaalla polyyppikuorma kasvoi intervention aikana (Wang ym. 2014).

2.2.4 Kokeelliset marjatutkimukset eläimillä

Aineiston rajaamiseksi eläin- ja solututkimuksista esitellään vain ne tutkimukset, joissa on käytetty tämän tutkimuksen kannalta oleellisia marjoja; mansikkaa, mustikkaa, puolukkaa, lakkaa, vadelmaa, mustaherukkaa tai polyfenolikoostumukseltaan mustikkaa muistuttavaa pensasmustikkaa. Näiden marjojen tai niistä valmistettujen uutteen vaikutusta syöpäkasvaimien muodostumiseen on tutkittu paksusuolisyövän kokeellisilla rotilla- (Lala ym. 2006, Boateng ym. 2007) ja hiirimalleilla (Misikangas ym. 2007, Päivärinta ym. 2006).

Paksusuolisyövän rottamalla käyttäneissä tutkimuksissa Fisher 344 -urorotille aiheutettiin kasvaimien muodostuminen karsinogeenin (azoxymethane) injeksiolla (Lala ym. 2006, Boateng ym. 2007). Lala tutkimusryhmineen syötti rotilla mustikkauutetta sisältävää ruokaa tutkiakseen sen vaikutuksia poikkeavien kryptien ryhmien (*engl. aberrant crypt foci*, ACF) muodostumiseen ja paksusuolen solujen jakautumiseen. Mustikkauutetta saaneilla rotilla keskikokoisten ACF:ien määrä paksusuolella oli 40 % pienempi ja suurten ACF:ien määrä peräti 70 % pienempi kuin kontrollieläimillä, mutta mustikkauute ei vaikuttanut merkitsevästi pienien ACF:ien määrään. Paksusuolen solujen jakautumisaktiivisuus sekä syklo-oksigenaasi-2 -geenin ilmentyminen olivat myös merkitsevästi pienemmät mustikkauutetta saaneilla rotilla kuin kontrollirotille. Mustikkauute tuotti korkean antosyaanipitoisuuden ulosteeseen, vähensi sappihappojen pitoisuutta, sekä lisäsi ulosteen määrää ja nestepitoisuutta kontrollieläimiin verrattuna (Lala ym. 2006). Toisessa samalla rottamalla tehdyssä tutkimuksessa Boateng (2007) ryhmineen selvitti fraktioimattoman mustikan (5 % rottien ruokavaliosta) vaikutusta ACF:ien muodostumiseen. Mustikkaa sisältävä dieetti vähensi ACF:ien muodostumista rottien paksusuolella 93 % kontrollidieettiin verrattuna. Erikokoisia ACF:ia ei tässä tutkimuksessa tarkasteltu erikseen (Boateng ym. 2007).

Pakkaskuivatun mansikan vaikutusta vastaavaan kemiallisesti aiheutettuun suolistokasvainten muodostumiseen on tutkittu hiirillä (Shi ym. 2015). Mansikkaa ruoan

mukana saaneiden hiirien kasvaimien määrä kokeen jälkeen oli 44–75 % kontrollihiirien kasvaimien määrästä. Mansikka myös vähensi useiden tulehdusta lisäävien ja syövän kehittymiseen liittyvien säätelytekijöiden ilmenemistä (Shi ym. 2015).

Paksusuolisyövän *Apc* min/+ -hiirimallissa syöpämuutoksia syntyy spontaanisti perinnöllisen *Apc*-geenin (*engl. adenomatous polyposis coli gene*) mutaation ansiosta (Moser ym. 1995). Tässä eläinmallissa kasvaimia muodostuu lähinnä ohutsuolen alueelle. Mallin käyttö perustuu siihen, että *Apc*-geenin mutaatiot liittyvät sekä perinnöllisten että muiden paksusuolisyöpien kehittymiseen. Fraktoimattoman mustikan, puolukan ja lakan vaikutuksia kasvaimien muodostumiseen tutkittiin tällä hiirimallilla (Misikangas ym. 2007). Lisäksi lakan siemenosaa, hedelmälihaa sekä niistä suolistossa vapautuvaa ellagihappoa tutkittiin erikseen (Päivärinta ym. 2006). Kukin marja osana hiirien dieettiä vähensi ohutsuolen kasvainten lukumäärää 15-30 %. Lakka ja puolukka pienensivät myös ohutsuolen distaaliosan kasvainten kokoa 60 % kontrolliin verrattuna, mutta mustikalla tätä vaikutusta ei ollut. Pelkän ellagihapon syöttäminen dieetin mukana sen sijaan tuotti suurempia kasvaimia hiirien ohutsuolen alkuosaan, mahdollisesti ohutsuolen alkupään korkean ellagihappopitoisuuden vuoksi (Päivärinta ym. 2006). Toisessa *Apc* min/+ -hiirimallilla tehdyssä kokeessa mustikan antosyaaniseos (Mirtoselect) osana eläinten dieettiä vähensi adenoomien muodostumista 30 % ja eristetty syanidiini-3-glukosidi 45 % kontrolliin verrattuna (Cooke ym. 2006). Näiden tutkimusten perusteella sekä kokonaiset marjat että niistä eristetyt polyfenolit voivat riittävän suurina pitoisuuksina vähentää kasvaimien muodostumista *Apc* min/+ -hiirillä (Misikangas ym. 2007, Päivärinta ym. 2006).

2.2.5 Solukokeet in vitro -fermentoiduilla marjoilla

Tämän tutkimuksen marjoilla sekä lukuisilla muilla marjoilla tehdyissä solualtistuskokeissa marjat ja polyfenolipitoiset marjauutteet ovat vähentäneet paksusuolisyöpäsolujen jakautumista tai lisänneet apoptoosia (Afrin ym. 2016). Polyfenolit ovat myös rajoittaneet tehokkaammin kasvainsolujen kuin normaalien paksusuolisolujen kasvua (Zhao ym. 2004). Todellisuudessa paksusuolisolut eivät kuitenkaan todennäköisesti altistu näin suurille määriin marjojen alkuperäisiä polyfenoleja, eivätkä suolistossa muodostuvat metaboliitit välttämättä vaikuta samalla tavalla (Gill ym. 2010, Brown ym. 2012, Brown ym. 2014, Correa-Betanzo ym. 2014).

Toistaiseksi vain muutamassa *in vitro* -kokeessa on tutkittu ruoansulatuksen vaikutusta marjojen kykyyn vaikuttaa paksusuolisyytäsolujen jakautumiseen tai elossa pysymiseen (Brown ym. 2012, Coates ym. 2007, Correa-Betanzo ym. 2014). Marja tai marjauute on ennen altistuskoetta käsitelty ruoansulatusta jäljittelevällä kemiallisella käsittelyllä tai kemiallisen ja mikrobiologisen käsittelyn yhdistelmällä. Coates (2007) tutkimusryhmineen tutki vadelmista valmistetun, vain ylemmän ruoansulatuskanavan simulaation läpikäyneen polyfenoliuutteen vaikutusta HT-29 -solujen solukiertoon. HT-29 -solujen altistaminen käsitellylle vadelmauutteelle vähensi merkittävästi G1-vaiheessa olevien eli solukiertoon ja jakautumiseen siirtyneiden solujen osuutta. Myöhemmässä kokeessa tutkittiin vadelmauutteen lisäksi mansikka- ja mustaherukkauutetta samalla menetelmällä, mutta ylemmän ruoansulatuskanavan simulaation lisäksi näytteet fermentoitiin kolmen eri henkilön mikrobeista yhdistetyn mikrobiston avulla (Brown ym. 2012). Tässä kokeessa mikään kolmesta marjauutteesta ei vähentänyt HT-29 -solujen jakautumista kummankaan käsittelyn jälkeen. Kaikilla kolmella marjauutteella oli kuitenkin kummankin käsittelyn jälkeen muita syövältä suojaavia ominaisuuksia, kuten genotoksisuuden, migraation ja invaasion vähentäminen. Mikrobikäsitteilyn jälkeen marjauutteet olivat soluille myrkyllisiä, mutta kuitenkin vähemmän kuin marjaton mikrobikäsitelty kontrollinäyte (Brown ym. 2012).

Correa-Betanzo ym. (2014) tutki mustikan ja mustikan metaboliittien vaikutusta HT-29 -kasvainsolujen ja CRL-1970 -paksusuolisolujen jakautumiseen. Ruoansulatuksen simulaatio oli jaettu kolmeen osaan; mahan kemialliseen simulaatioon, ohutsuolen kemialliseen simulaatioon sekä paksusuolen mikrobiologiseen simulaatioon. Molempien käytettyjen solulinjojen kasvu väheni annoksen mukaisesti sekä käsittelemättömällä mustikalla että mahan simulaation läpikäyneellä mustikalla. HT-29 -solujen kasvu väheni 90 % ja CRL-1970 -solujen kasvu 60 %. Ohutsuolisimulaation tai ohutsuoli- ja paksusuolisimulaation jälkeen mustikkanäytteet inhiboivat kumpaakin solulinjaa enää 40 %. Lisäksi mustikkanäytteiden kemiallinen antioksidatiokyky väheni ohutsuolisimulaation myötä noin puoleen alkuperäisestä ja paksusuolisimulaation jälkeen olemattomiin. Kokeet tehtiin vielä kahdella mustikan alkuperäisellä antosyaanilla, sekä antosyaanien tunnetulla hajoamistuotteella, protokatekiinihapolla. Kuten käsittelemätön mustikka ja mahasimulaation läpikäynyt mustikka, myös antosyaanit vähensivät enemmän HT-29 -solujen kuin CRL-1970 -solujen kasvua. Protokatekiinihapo sen sijaan rajoitti ainoastaan CRL-1970 -solujen kasvua ja sitäkin vain 20 %. Kuitenkin tämän

ruoansulatuksen simulaation perusteella antosyaaneista vain asetyyliryhmän sisältävät antosyaaniglukosidit voisivat kulkeutua sellaisenaan paksusuoleen ja mahdollisesti yltää biologisesti merkittävään pitoisuuteen (Correa-Betanzo ym. 2014). Antosyaanien hajotustuotteiden määrä suolessa voi sen sijaan olla huomattavasti suurempi.

Edellä mainituissa tutkimuksissa käytetyn keinotekoisen mikrobiston perusteella ei voida erityisen luotettavasti arvioida polyfenolien todellista aineenvaihduntaa, sillä kummassakin käytettiin vain yhtä koemikrobistoa, mutta todellisuudessa ihmisen suolistomikrobisto on yksilöllinen ja polyfenolien aineenvaihdunnassa on suurta vaihtelua (Tomás-Barberán ym. 2014). Ulostenäytteen mikrobikoostumus ei myöskään hyvin kuvaa koko ruoansulatuskanavan mikrobiston koostumusta (Savage 1977).

Marjojen pitkäaikaisen nauttimisen vaikutusta ulosteveden koostumukseen tai ulostevedelle altistettujen solujen kasvuun ei ole tutkittu aiemmin. KarniMari on ensimmäinen ja toistaiseksi myös ainoa tutkimus, jossa paksusuolisyöpäsoluja on altistettu marjoista suolistossa *in vivo* muodostuneille metaboliiteille.

3 Tutkimuksen tavoitteet

Tämän työn tavoitteena oli tutkia, miten runsas marjojen käyttö vaikuttaa ulosteveden kemialliseen koostumukseen ja ulostevedelle altistettujen paksusuolisyöpäsolujen elossa pysymiseen eli viabiliteettiin, kun punaisen lihan määrä ruokavaliossa on vakioitu. Lisäksi haluttiin selvittää, onko solujen viabiliteetti yhteydessä polyfenolien metaboliittien pitoisuuksiin ulostevedessä. Tutkimuskysymykset jaettiin seuraaviin osakysymyksiin:

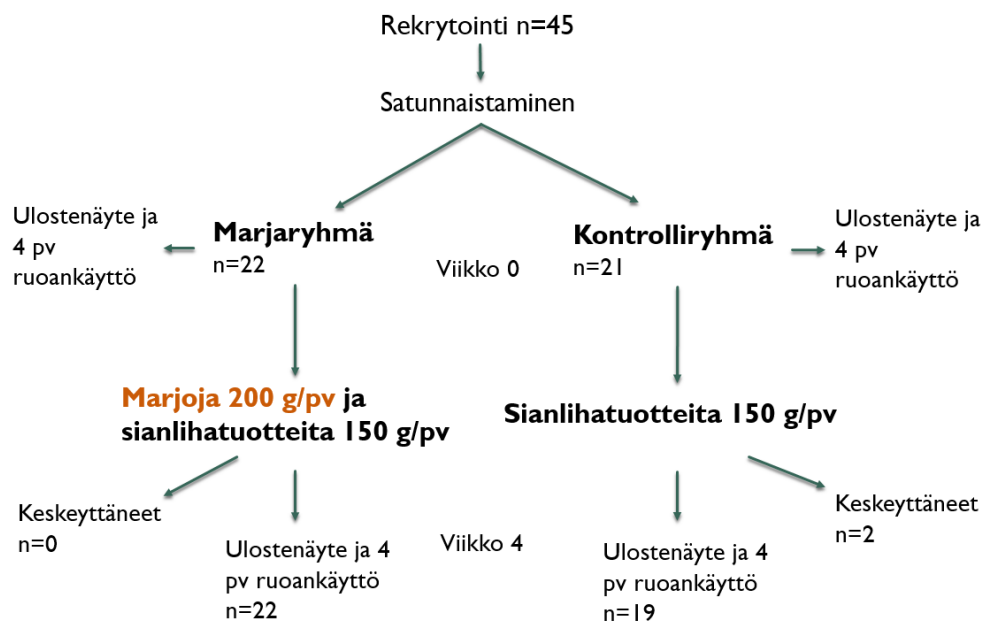
1. Tuottaako neljän viikon runsas marjojen päivittäinen käyttö (200 g/pv) ulosteveettä, joka vaikuttaa paksusuolisyöpäsolujen viabiliteettiin eri tavalla kuin kontrolliryhmän ulostevesi?
 - 1.1 Vaikuttavatko marjaryhmän ulostevesinäytteet intervention jälkeen paksusuolisyöpäsolujen viabiliteettiin eri tavalla kuin kontrolliryhmän näytteet?
 - 1.2 Miten marjaryhmän ja kontrolliryhmän näytteet vaikuttavat intervention jälkeen vertailusolujen eli fibroblastien viabiliteettiin?
2. Onko solujen viabiliteetti yhteydessä ulostevedestä määritettyihin polyfenolimetaboliittien pitoisuuksiin?
 - 2.1 Onko ulostevedestä määritetyissä polyfenolimetaboliittien pitoisuuksissa eroa ryhmien välillä intervention loppupisteessä?
 - 2.2 Onko määritettyjen polyfenolimetaboliittien pitoisuuksien ja solujen viabiliteetin välillä korrelaatioita intervention loppupisteessä?

Valittujen tutkimusongelmien perusteena oli hypoteesi, jonka mukaan marjapitoinen ruokavalio ehkäisee paksusuolisyöpää lisäämällä suolen sisällön polyfenolien ja niiden metaboliittien määrää. Nämä yhdisteet saattavat estää tai hidastaa paksusuolisyöpää vaikuttamalla syöpäominaisuuksia saavuttaneiden solujen jakautumiseen ja / tai elossa pysymiseen paksusuolen epiteelissä.

4 Aineisto ja menetelmät

4.1. Interventio ja ulostenäytteiden keräys

Tässä työssä käytetyt ulostenäytteet ovat peräisin KarniMari-tutkimuksesta, joka suoritettiin vuonna 2014 Helsingin yliopiston elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksella. Helsingin yliopiston ihmistieteiden eettisen arvioinnin toimikunta antoi tutkimukselle myönteisen lausunnon heinäkuussa 2014. KarniMari oli neljän viikon ruokavaliointerventio, jossa tutkittavat olivat terveitä aikuisia (kuva 3). Tutkittavat rekrytoitiin tiedottamalla tutkimuksesta Helsingin yliopiston ainejärjestöjen postituslistoilla, Facebookissa, Helsingin yliopiston intranetissä sekä Viikin yliopistokampuksen luennoilla. Poissulkukriteereinä pidettiin raskautta ja imetystä, rasva-aineenvaihduntaan tai verenpaineeseen vaikuttavien lääkkeiden käyttöä, runsasta ravintolisien käyttöä (mm. kalaöljykapselit), runsasta kalansyöntiä (yli 4 annosta viikossa), erittäin korkeaa seerumin kolesterolipitoisuutta, runsasta raskaan ruumiillisen rasituksen harrastamista sekä tupakointia. Tutkimukseen rekrytoitiin yhteensä 71 tutkittavaa, joista 69 aloitti tutkimuksen, ja heistä 45 osallistui KarniMarin suolistoa tutkivaan osaan. Tutkittavat olivat 20-67-vuotiaita.



Kuva 3. KarniMari-interventio tutkimuskaavio.

Tutkittavat satunnaistettiin kahteen interventioryhmään, joista toisen ryhmän henkilöt söivät tutkimusjakson aikana päivittäin noin 200 g kotimaisia marjoja. Jokaisella tutkimusviikolla tutkittavat söivät kaikkiaan 400 g mustikkaa, 250 g mansikkaa, 200 g puolukkaa, 200 g vadelmaa, 200 g mustaherukkaa ja 200 g lakkaa. Molempien ryhmien henkilöt söivät päivittäin lisäksi noin 150 g sianlihatuotteita. Marjoja sekä sianlihatuotteita saaneiden tutkittavien ryhmään viitataan tässä tutkielmassa nimellä marjaryhmä, ja vain lihatuotteita saaneiden tutkittavien ryhmään nimellä kontrolliryhmä. Marjaryhmässä oli tutkimuksen alkaessa 22 tutkittavaa, joista 13 oli naisia ja 9 miehiä. Kontrolliryhmässä oli 21 tutkittavaa, joista 13 oli naisia ja 8 miehiä. Marjat ja liha jaettiin viikoittain tutkimusyksiköstä, ja muiden marjojen ja punaisen lihan nauttimisesta tuli pidättyä tutkimusjakson aikana. Siipikarjan syöminen oli sallittua, ja kala-aterioita tutkittavat saivat halutessaan syödä korkeintaan kaksi viikossa. Muutoin tutkittavia kehoitettiin syömään niin kuin he tavallisesti söisivät. Kontrolliryhmän tutkittavista kaksi keskeytti tutkimuksen; toinen ei pitänyt tutkimuselintarvikkeista, ja toinen jätti tulematta viimeiselle tutkimuskäynnille, eikä häntä enää tavoitettu.

Tutkimusjakson alkaessa ja päättyessä tutkittavat keräsivät ulostenäytteet kahdelta peräkkäiseltä päivältä. Ulostenäytteen keräys suoritettiin kotona tutkimusyksiköstä saatujen tarkkojen ohjeiden mukaisesti (liite 1). Kaikki uloste punnittiin, ja kummankin päivän ensimmäisellä ulostuskerralla kerättiin näyte annettuun näyteputkeen. Näytteet pakastettiin kotona ja toimitettiin jäisenä tutkimusyksikköön, jossa ne säilytettiin pakastettuna -70 °C:ssa.

4.2 Ulosteveden eristys ja fenolisten happojen määrittäminen

Näytteiden käsittelyn alkuvaiheessa kahdesta ulostenäyteputkesta ulosteveden eristykseen valittiin näyte, jossa ulostetta oli runsaammin. Saatu ulostevesimäärä oli kuitenkin vähäinen, ja siksi siirryttiin käyttämään kahdesta putkesta yhdistettyä näytettä. Ulostenäytteet laimennettiin suodatettuun ja puhdistettuun veteen (MilliQ) suhteessa 1:1 ja homogenoitiin kahden minuutin ajan (13 000 – 15 000 rpm, T18 Digital Ultra Turrax). Homogenaattia sentrifugoitiin kahden tunnin ajan ultrasentrifuugilla (Optima Max, Beckman-Coulter) 50 000 G:n voimalla, minkä jälkeen supernatantti eli ulostevesi eroteltiin kiinteästä aineksesta. Ulosteveden pH mitattiin (Accumet AB150, Fisher

Scientific) ja ulostevesi suodatettiin portaittain erikokoisilla steriileillä suodattimilla, viimeiseksi 0,22 mikrometrin suodattimella (Minisart® Syringe Filter 0,22 µm, Sartorius). Kontrolliryhmän näytteistä menetettiin yksi tutkimuksen alkupisteessä ja kolme loppupisteessä, koska ne eivät paksuutensa vuoksi suodattuneet lainkaan edes 1,2 mikrometrin suodattimen läpi. Soluultistuskokeita varten käyttökelpoisia näytteitä saatiin intervention alkupisteessä kontrolliryhmästä 16 henkilöltä ja marjaryhmästä 21 henkilöltä, loppupisteessä kontrolliryhmästä 15 henkilöltä ja marjaryhmästä 21 henkilöltä. Suodatetut näytteet säilytettiin -70 °C:ssa. Solukokeiden yhteydessä näytteet sulatettiin huoneenlämmössä ja sulaneet näytteet pidettiin jäähauteessa. Näytteet sulatettiin kokeita varten kaiken kaikkiaan kahdesta kolmeen kertaa.

Eristetystä ulostevedestä määritettiin polyfenolimetaboliittien pitoisuuksia erittäin korkean suorituskyvyn nestekromatografilla, jossa käytettiin diodirivi- ja fluoresenssidetektoreja. Menetelmässä käytettiin ulkoista standardia. Määritykset suoritti Tuuli Koivumäki Helsingin yliopiston elintarvike- ja ravitsemustieteiden laitokselta.

4.3 Soluviljelmien aloitus ja ylläpito

Kaikki solutyöskentely suoritettiin steriilissä laminaarikaapissa (Biowizard, Kojair®). Solukokeissa käytettiin apinan fibroblasteja (CV1-P) sekä kahta ihmisen paksusuolisyövän kasvainsolulinjaa (HCA-7 ja Caco-2).

Nestetyypessä säilytettyjä CV1-P -soluja sulatettiin +37 °C vesihauteessa noin kahden minuutin ajan. Sulaneet solut pipetoitiin T25 -kasvatuspulloon 10 millilitraan esilämmitettyä kasvatusliuosta (Dulbecco's modified Eagle's medium, Lonza) johon oli lisätty 10 % vasikan seerumia (Gibco), 1 % penisilliini-streptomysiiniä (Lonza) ja 1 % L-glutamiinia (Lonza). Solujen kasvattamisessa käytettiin hiilidioksidi-inkubaattoria (Heracell™ 150, Thermo Fisher Scientific) jossa lämpötila oli +37 °C ja hiilidioksidipitoisuus 5 %. Seuraavana päivänä solujen kasvu tarkistettiin ja kasvatusliuos vaihdettiin uuteen. Solujen annettiin kasvaa kaksi päivää ennen jatkoviljelyä tai kunnes solut peittivät mikroskoopilla tarkasteltuna noin 70 % kasvatuspullon pinta-alasta.

Jatkoviljely aloitettiin aina poistamalla kasvatusliuos ja huuhtelemalla viljelmää kahdesti 2 millilitralla fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (Phosphate Buffered Saline without Ca

and Mg, Lonza) soluliitosten kalsiumin poistamiseksi. Viljelmään lisättiin sitten 2 millilitraa trypsiiniä (Trypsin EDTA, Lonza) ja inkuboitiin kasvatuskaapissa noin 7 minuuttia, kunnes soluliitokset olivat hajonneet ja suurin osa soluista irronnut toisistaan ja kasvatusmaljan pohjasta. Solususpensioon lisättiin sitten 8 millilitraa esilämmitettyä kasvatusliuosta, joka inaktivoi trypsiinin. Suspensio kerättiin pipettiin ja siitä pipetoitiin kahteen tai kolmeen T75-pulloon solujen määrästä ja viljelmän toivotusta kasvunopeudesta riippuen 2-5 millilitraa/pullo. Kuhunkin pulloon lisättiin kasvatusliuosta siten, että pullon solususpension kokonaistilavuudeksi tuli 15 millilitraa. Solumäärän annettiin jälleen kasvaa kasvatuskaapissa, kunnes solut peittivät noin 70 % pullojen pohjasta. Soluviljelmiä säilytettiin inkubaattorissa ja soluja jaettiin kasvunopeudesta riippuen 2-4 päivän välein.

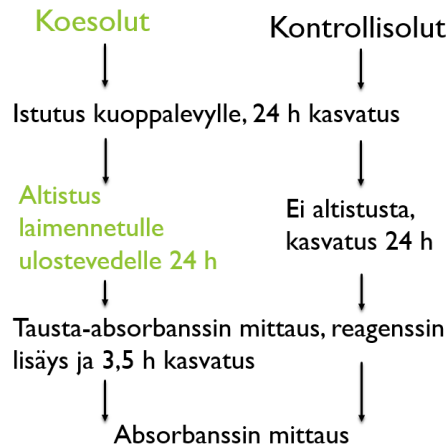
HCA-7 -solujen viljely aloitettiin samalla tavalla. Solut olivat tiukemmin kiinni alustassa kuin CV1-P-solut, joten niiden irrottamiseksi viljelmää huuhdeltiin kahdesti kolmella millilitralla fosfaattipuskuroitua suolaliuosta. Trypsiniä lisättiin kolme millilitraa ja viljelmää inkuboitiin 10 minuuttia. Tätä menettelyä käytettiin myös jatkoviljelyissä.

Caco-2 -solujen viljelyn aloituksessa kasvatusliuos vaihdettiin uuteen jo samana päivänä noin viiden tunnin inkuboinnin jälkeen. Muutoin aloitus ja jatkoviljelyt tehtiin samalla tavalla kuin CV1-P -soluille.

Viljelmiä tarkasteltiin mikroskoopilla (Eclipse TS-100F, Nikon) poikkeavuuksien havaitsemiseksi ja viljelmistä otettiin kuvat mikroskooppiin liitetyllä kameralla (Digital Sight DS-L2, Nikon) 10-kertaisella suurennoksella ennen solujen irrottamista. Mikäli toisessa pullossa havaittiin jotakin epäilyttävää, tehtiin jatkoviljelyt normaalista viljelmästä. Tavoiteltu solujen määrä kokeiden aloittamispäivänä oli aina 70 % kasvatuspullon pinta-alasta. Käytännössä peittävyys oli 60 - 90 % solujen kasvunopeudesta riippuen.

4.4 Ulosteviesialtistuskoe

Kokeen periaatteena oli selvittää elävien solujen suhteellinen määrä kontrollisoluihin nähden 24 tunnin ulosteviesialtistuksen jälkeen (kuva 4).



Kuva 4. Ulostevesialtistuskoe. Saatu altistettujen solujen tuottama absorbanssin muutos jaettiin kontrollisolujen absorbanssin muutoksella ja kerrottiin sadalla, jolloin saatiin solujen viabiliteettia kuvaava prosenttiluku. Jokaisella ulostevesinäytteellä tehtiin kolme rinnakkaista altistusta, joista laskettiin keskiarvo. Kaikki altistuskokeet tehtiin kolmella solulinjalla; HCA-7, Caco-2 ja CV1-P.

Elävien solujen määrä arvioitiin tähän tarkoitukseen kehitetyn CCK-8 -reagenssin (Cell Counting kit-8, Sigma) avulla. Valmisteen sisältämä WST-8 (water-soluble tetrazolium salt, [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]) muodostaa pelkistyessään formazan-väriainetta. Elävien solujen dehydrogenaasientsyymien aktiivisuus tuottaa pelkistyspotentiaalia, jolloin WST-8 pelkistyy formazaniksi muuttaen liuoksen väriä. Muodostuneen formazanin määrä on valmistajan mukaan suoraan verrannollinen elävien solujen määrään. Solumäärä arvioidaan mittaamalla näytteen absorbanssi levylukijan avulla 450 nm suodattimella ja vertaamalla lukemaa tunnetuilla solumäärillä tehtyyn kalibrointikäyrään.

Tässä kokeessa ei kuitenkaan oltu kiinnostuneita solujen absoluuttisesta määrästä altistuksen jälkeen, vaan solujen suhteellisesta määrästä altistamattomiin kontrollisoluihin verrattuna. Ulostenäytteen ja kasvatusliuoksen värin sekä solujen taustavaikutuksen poistamiseksi jokaisesta kuopasta mitattiin absorbanssi levylukijalla (Multiskan FC, Thermo Scientific) ennen reagenssin annostelua. CCK-8- reagenssia annosteltiin jokaiseen kuoppaan 10 mikrolitraa ja levyjä inkuboitui 3,5 tuntia ennen loppupisteen absorbanssin mittaamista. Muodostuneen formazanin osuus lopullisesta absorbanssista saatiin vähentämällä tuloksesta lähtötilanteen tausta-absorbanssi. Jokaisen näytteen kullekin laimennokselle altistettujen solujen absorbanssin muutos jaettiin kontrollisolujen absorbanssin muutoksella ja kerrottiin sadalla, jolloin saatiin suhteellista solumäärää kuvaava prosenttiluku.

Ennen altistuskokeiden aloittamista määritettiin kunkin solulinjan optimaalinen kuoppiin istutettava solumäärä. Tavoitteena oli löytää sellainen solumäärä, joka tuottaisi riittävän suuren absorbanssin muutoksen CCK-8-reagenssin kanssa, mutta jättäisi tilaa myös mahdolliselle solujen jakautumiselle kokeen aikana. Sopivan solumäärän tutkimiseksi kuoppalevyille istutettiin soluja kasvavina määrinä alkaen määrästä 100 solua/kuoppa. Soluille tehtiin CCK-8-käsittely ja absorbanssien perusteella piirrettiin kalibrintikäyrä. Tuloksista piirretyn käyrän ja kuoppien silmämääräisen mikroskooppitarkastelun perusteella sopivaksi CV1-P -solujen määräksi valittiin 20 000 solua/kuoppa, HCA-7 -solujen määräksi 200 000 ja Caco-2 -solujen määräksi 50 000 solua/kuoppa.

Ennen solujen istuttamista kuoppalevyille solut irrotettiin kasvatuspullosta, solususpension elävien solujen määrä laskettiin ja suspensio laimennettiin esilämmitetyllä kasvatusliuoksella solutiheydeltään sopivaksi. Laskenta tehtiin automaattisella solulaskurilla (Countess™ Automated Cell Counter, Thermo Scientific). Laskentaa varten solut värjättiin lisäämällä 100 mikrolitraan solususpensiota 100 mikrolitraa väriainetta (Trypan Blue 0,4 %, Thermo Fisher Scientific) pipetillä varovasti sekoittaen. Värjättyä solususpensiota pipetoitiin laskentalevyn kumpaankin kammioon 10 mikrolitraa, solumäärä laskettiin ja haluttu laimennussuhde laskettiin kahden näytteen keskiarvon perusteella.

Solususpension solutiheys säädettiin siten, että sadassa mikrolitrassa oli yhteen kuoppaan tarvittava määrä soluja. Fibroblasteilla altistuskokeisiin käytetyn liuoksen solutiheys oli 2×10^4 solua/ml, HCA-7 -soluilla 2×10^5 solua/ml ja Caco-2 -soluilla 5×10^4 solua/ml. Solususpensiota pipetoitiin 100 μ l/kuoppa monikanavapipetillä pipetointikaukalon kautta. Koska liuoksen seistessä solut alkavat vajota kohti kaukalon pohjaa, pyrittiin pipetointi suorittamaan mahdollisimman nopeasti ja liuosta sekoitettiin pipetillä pipetointien välissä. Tasaisen jakautumisen varmistamiseksi kontrollisoluja istutettiin sekä vaaka- että pystyriville jokaiselle kuoppalevyille. Solujen annettiin kiinnittyä ja kasvaa kuoppalevyillä kasvatuskaapissa noin vuorokauden ajan.

Altistuskokeen periaatteena oli altistaa kuoppalevyille istutettuja soluja ulostevedelle ja verrata kahden interventiorryhmän ulostevesinäytteiden vaikutusta solujen viabiliteettiin. Kokeen suunnittelussa päätavoite oli siten ryhmien välisen mahdollisen eron esiin tuominen ja tähän eroon vaikuttavien sekoittavien tekijöiden minimoiminen. Näytteiden asettelussa haluttiin minimoida systemaattisen virheen mahdollisuus, mutta kuitenkin

mahdollistaa virheetön ja tehokas työskentely. Tämän vuoksi asettelu ei ollut satunnaistettu vaan näytteet järjestettiin kuoppalevyille siten, että interventioryhmien näytteet jakautuivat kaikille levyille mahdollisimman tasaisesti. Satunnaisvirheen minimoimiseksi jokaisen näytteen jokaisella laimennoksella tehtiin kolme rinnakkaisaltistusta. Tällä menettelyllä huomioitiin solutyöskentelyn epätarkkuus. Rinnakkaiset ulostevesinäytteet olivat kuitenkin samaa laimennettua näytettä, sillä näytteet eivät muutoin olisi riittäneet kaikkiin solukokeisiin.

Koska solut eivät olisi selvinneet pelkässä ulostevedessä, sekoitettiin ulostevesinäytteet kokeita varten kasvatusliuokseen. Ulostevesinäytteiden laimennukseen käytettyyn kasvatusliuokseen (Dulbecco's modified Eagle's medium, Lonza) lisättiin 1 % vasikan seerumia (Gibco), 1 % penisilliini-streptomysiiniä (Lonza) sekä 1 % L-glutamiinia (Lonza). Näytteistä tehtiin kolme eri laimennosta, joissa oli 10 % / 20 % / 30 % ulosteveettä, koska parhaiten *in vivo* -olosuhteita vastaavaa pitoisuutta ei tunneta. Laimennokset tehtiin esilämmitettyyn kasvatusliuokseen, mutta käytännössä määrät olivat pieniä ja viilenivät huoneenlämpöisiksi ennen altistusta.

Kuoppalevyille istutetut solut altistettiin laimennetuille ulostevesinäytteille 24 tunnin kasvatuksen jälkeen. Pipetointi suoritettiin yksi laimennettu näyte kerrallaan siten, että ensin poistettiin pipetillä kaikista kolmesta rinnakkaisesta kuopasta vanha kasvatusliuos. Jokaiseen kuoppaan pipetoitiin sitten 100 µl laimennettua näytettä. Myös kontrollisolujen vanha kasvatusliuos poistettiin ja vaihdettiin samaan liuokseen, jolla ulostevesinäytteet oli laimennettu. Yhden kuoppalevyn pipetointiin kului aikaa 20–30 minuuttia, minkä jälkeen levy siirrettiin takaisin kasvatuskaappiin. Soluja altistettiin inkubaattorissa vuorokauden ajan.

Vuorokauden kuluttua ulostevesialistuksen aloittamisesta mitattiin kaikkien kuoppien tausta-absorbanssi kuoppalevylukijalla 450 nanometrin suodattimella. Tämän jälkeen jokaiseen kuoppaan pipetoitiin monikanavapipetillä 10 µl CCK-8 -reagenssia ja levyjä inkuboitiin 3,5 tuntia, minkä jälkeen absorbanssi mitattiin uudelleen.

Jokaisen kuopan absorbanssista vähennettiin kyseisen kuopan tausta-absorbanssi, eli laskettiin solujen tuottama absorbanssin muutos. Jokaisen näytteen ja kontrollisolujen rinnakkaisnäytteistä laskettiin muutoksen keskiarvot. Altistettujen solujen absorbanssin muutos jaettiin kontrollisolujen absorbanssin muutoksella ja kerrottiin sadalla, jolloin

jokaiselle altistukselle saatiin elävien solujen suhteellista määrää kuvaava prosenttiluku eli viabiliteetti.

Altistuskokeen päätteeksi solujen morfologisia muutoksia tarkasteltiin mikroskoopilla. Jokaisesta näytteen kolmesta rinnakkaiskuopasta kuvattiin yksi edustava kuoppa mikroskooppiin liitetyllä kameralla. Jokaisesta näytteestä otettiin siis kolme kuvaa, yksi kustakin laimennoksesta. Myös kontrollisoluista taltioitiin edustavat kuvat. Kuvat otettiin kuopan keskiosasta 10-kertaisella suurennoksella. Esimerkkikuvia aineistosta on esitetty kuvissa 9, 10 ja 11 liitteessä 2.

4.5 Ulosteveden ja CCK-8 -reagenssin interaktion testaus

Koetta suunniteltaessa oli ajateltu, että solujen ja ulosteveden absorbanssin mittaaminen ennen CCK-8 -reagenssin lisäämistä toimisi riittävänä kontrollina ulosteveden antamalle tausta-absorbanssille. Aineiston käsittelyn aikana heräsi kuitenkin epäily, että ulostevedellä saattaisi olla itsenäinen vaikutus CCK-8 -reagenssin pelkistymiseen. Tätä interaktiota tutkittiin toistamalla kuuden eri näytteen ulostevesialtistus Caco-2 -soluilla siten, että kuoppalevyille lisättiin kutakin kasvatusliuoksella laimennettua ulostevedettä myös yhteen tyhjään kuoppaan. Vuorokauden kuluttua levyiltä mitattiin kunkin kuopan tausta-absorbanssi, pipetoitiin CCK-8 -reagenssia sekä solukuoppiin että pelkkää ulostevesilaimennosta sisältäviin kuoppiin ja toistettiin absorbanssien mittausta 3,5 tunnin kuluttua. Tulokset on esitetty liitteessä 3. Ulosteveden ja reagenssin interaktiosta saatua absorbanssia ei kuitenkaan voitu vähentää altistettujen solujen tuottamasta absorbanssista, sillä oletettavasti solujen kanssa vuorovaikutuksessa olleen ulosteveden pelkistyspotentiaali ei ole sama kuin tyhjässä kuopassa olleen ulosteveden. Koetta ei myöskään voitu toistaa siten, että ulostevesi olisi vaihdettu kasvatusliuokseen ennen mittausta, sillä ulostevedelle altistaminen heikensi solujen kiinnittymistä alustaan. Merkittävä osa soluista irtosi kuopan pohjasta ja olisi siten menetetty liuoksen vaihdon yhteydessä. Ulosteveden ja reagenssin välisen interaktion todellista suuruutta ei siis voitu luotettavasti arvioida, mikä on syytä huomioida viabiliteettitulosten tulkinnassa.

4.6 Tilastolliset analyysit

Tilastolliset analyysit tehtiin IBM SPSS Statistics 23 -ohjelmalla (IBM). Solujen viabiliteetin eroa interventioryhmien välillä intervention alkupisteessä testattiin Mann-Whitney U -testillä. Viabiliteetin ryhmien välistä eroa intervention loppupisteessä testattiin kovarianssianalyysillä (ANCOVA), jossa intervention alkupisteen viabiliteetti asetettiin kovariaatiksi. Joidenkin ulostevesien määrä oli vähäinen ja näyte loppui kesken solualtistuskokeiden (taulukko 1).

Taulukko 1. Tilastollisiin analyyseihin käytettävissä olleiden viabiliteettitulosten määrät kutakin solulinjaa ja ulosteveden pitoisuutta kohti (kpl). Kovarianssianalyysiin voitiin käyttää vain niiden tutkittavien näytteitä, joiden ulostenäytteillä ulosteveden eristys ja solualtistuskoe onnistuivat sekä tutkimuksen alku- että loppupisteessä.

	Ulosteveden pitoisuus	Marjaryhmä			Kontrolliryhmä		
		Solulinja CV1-P	HCA-7	Caco-2	Solulinja CV1-P	HCA-7	Caco-2
Loppupiste	10 %	21	21	21	15	15	15
	20 %	20	20	20	15	15	15
	30 %	20	20	20	15	15	15
Alkupiste	10 %	21	21	20	17	17	16
	20 %	20	20	20	17	17	16
	30 %	20	20	20	17	17	16
Kovarianssi	10 %	20	20	19	14	14	13
	20 %	18	18	18	14	14	13
	30 %	18	18	18	14	14	13

Ulosteveden fenolisten happojen pitoisuuksien ryhmien välisiä eroja intervention loppupisteessä testattiin Mann-Whitney U -testillä ja fenolisten happojen pitoisuuksien yhteyttä solujen viabiliteettiin Spearmanin korrelaatiotestillä. Ulosteveden pH:n mahdollista osuutta saatuihin tuloksiin tutkittiin testaamalla pH:n ryhmien välistä eroa Mann-Whitney U -testillä ja pH:n yhteyttä fenolisten happojen pitoisuuksiin Spearmanin korrelaatiotestillä.

5 Tulokset

5.1 Marjaruokavalion vaikutus ulostevedelle altistettujen solujen viabiliteettiin

Neljän viikon intervention jälkeen ulostevedelle altistettujen solujen viabiliteetissa oli merkitseviä eroja interventioryhmien välillä (taulukko 2). Marjaryhmän ulostevesi 30 %:n pitoisuudella vähensi kaikkien kolmen solulinjan viabiliteettia ja 20 %:n pitoisuudella solulinjojen CV1-P ja HCA-7 viabiliteettia enemmän kuin kontrolliryhmän ulostevesi (kuva 5). Myös Caco-2 -solujen altistuskokeessa solujen viabiliteetti oli kontrolliryhmässä suurempi ulosteveden 20 %:n pitoisuudella, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p=0.098$). Ulostevden pienimmällä pitoisuudella (10 %) tehdyissä kokeissa ryhmien välinen ero oli kaikilla kolmella solulinjalla samansuuntainen kuin suuremmilla pitoisuuksilla, mutta pieni eikä tilastollisesti merkitsevä.

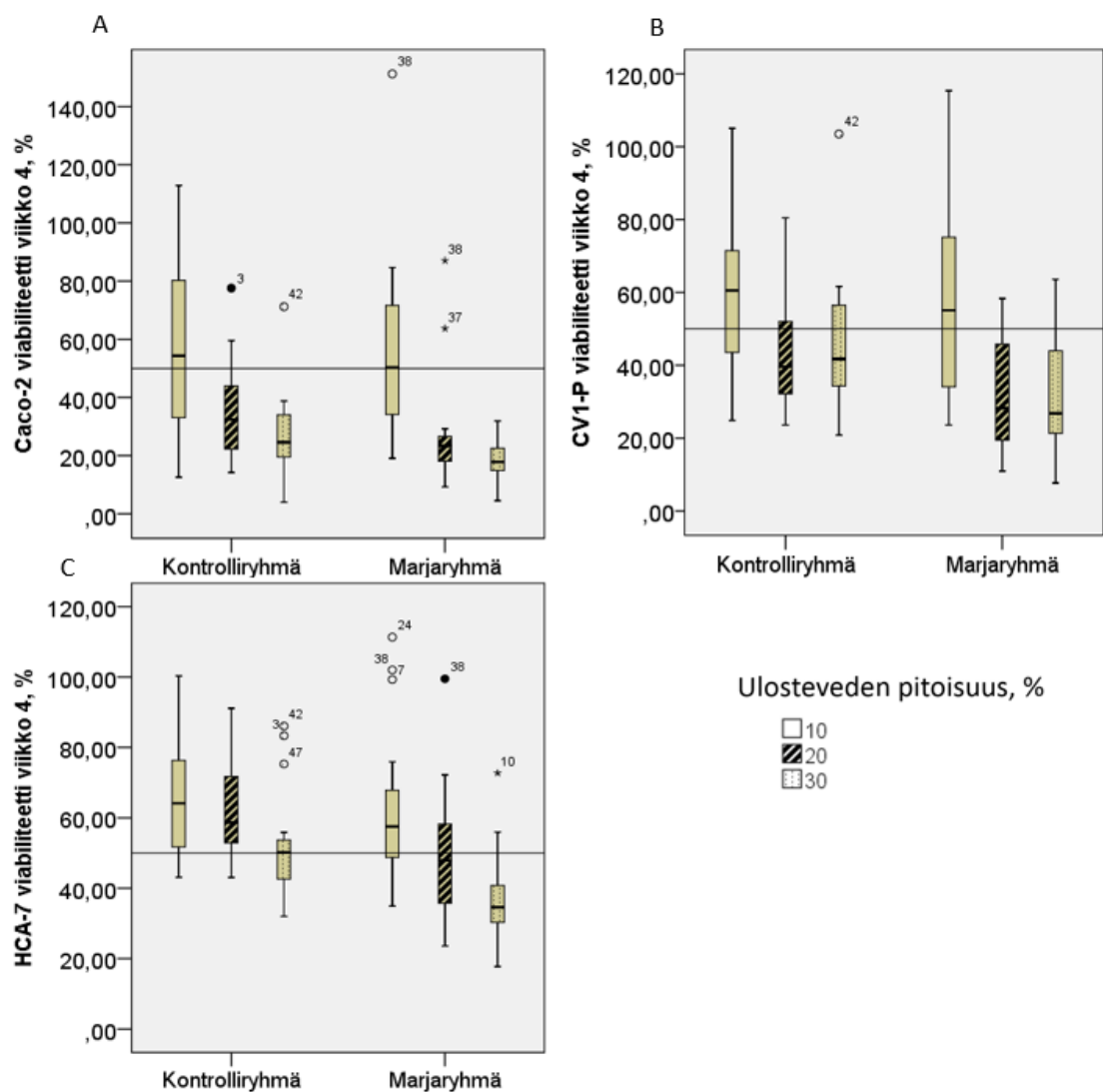
Intervention alkupisteessä ulostevesinäytteiden vaikutus solujen viabiliteettiin ei eronnut merkitsevästi ryhmien välillä (liite 4, kuva 13). Työssä tarkasteltiin myös viabiliteetin muutosta intervention alkupisteestä loppupisteeseen. Nämä tulokset on esitetty liitteen 5 kuvassa 14.

Taulukko 2: Solujen viabiliteetti interventoryhmissä (keskiarvo \pm keskihajonta) intervention alku- ja loppupisteessä. Näytteiden lukumäärä vaihtelee, kuten taulukossa 1 on esitetty.

	Solulinja, näytteen pitoisuus	Marjaryhmä viikko 0	Kontrolliryhmä viikko 0	Ryhmi- en ero ^a viikko 0 p=	Marjaryhmä viikko 4	Kontrolliryhmä viikko 4	Ryhmi- en ero ^b viikko 4 p=
CV1-P	10 %	57,5 \pm 22,5	53,6 \pm 22,3	0.750	56,1 \pm 24,9	58,6 \pm 22,0	0.565
	20 %	36,3 \pm 11,7	34,7 \pm 15,4	0.311	31,8 \pm 14,5	43,1 \pm 15,8	0.003*
	30 %	32,3 \pm 13,8	38,0 \pm 19,1	0.297	32,0 \pm 16,8	46,4 \pm 20,7	0.009*
HCA-7	10 %	56,7 \pm 21,6	51,3 \pm 17,3	0.542	63,0 \pm 20,2	65,2 \pm 17,1	0.6
	20 %	42,2 \pm 16,8	32,6 \pm 10,2	0.117	49,6 \pm 17,9	62,6 \pm 15,1	0.007*
	30 %	32,7 \pm 10,9	27,7 \pm 10,5	0.177	36,8 \pm 12,0	52,8 \pm 16,5	0.000*
Caco-2	10 %	51,9 \pm 18,4	44,9 \pm 14,2	0.305	54,5 \pm 29,8	55,7 \pm 30,2	0.542
	20 %	30,2 \pm 11,0	28,5 \pm 7,6	0.789	26,6 \pm 18,0	35,4 \pm 18,2	0.098
	30 %	26,1 \pm 10,4	28,3 \pm 10,7	0.369	18,4 \pm 7,1	27,9 \pm 15,1	0,032*

a: Mann-Whitney U -testi **b:** kovarianssi, luonnollisella logaritmillä muunnetut muuttuja

* Tilastollisesti merkitsevät ero



Kuva 5: Ulostevedelle altistettujen solujen viabiliteetti (% kontrollisolusta) marjaryhmässä ja kontrolliryhmässä ulosteveden pitoisuuden mukaan intervention loppupisteessä 24 h ulostevesialtistuksen jälkeen. Kuvissa on vertailun helpottamiseksi asetettu vaakaviiva kohtaan, jossa altistettujen solujen viabiliteetti on 50 % kontrollisolusta. Suorakaide sisältää 50 % havainnoista ja poikkiviiva osoittaa mediaanin paikan. Janojen päät vastaavat pienintä ja suurinta arvoa. Poikkeavat havainnot on merkitty kyseessä olevan näytteen tutkimusnumerolla. Ryhmien välisen eron p-arvot on esitetty taulukossa 2. A: Caco-2, ryhmien välinen ero merkitsevä 30 % ulostevesinäytteillä (ANCOVA) B: CV1-P, ryhmien välinen ero merkitsevä 20 ja 30 % ulostevesinäytteillä (ANCOVA) C: HCA-7, ryhmien välinen ero merkitsevä 20 % ja 30 % ulostevesinäytteillä (ANCOVA)

5.2 Ulosteveden vaikutus eri solulinjojen viabiliteettiin

Ulostevesinäytteet vähensivät sekä kasvainsolujen että fibroblastien viabiliteettia kontrollisoluihin nähden sekä ennen interventiota että kummassakin interventioryhmässä intervention jälkeen (taulukko 2). Kasvainsolujen (HCA-7, Caco-2) viabiliteetti oli pienin ulosteveden suurimmalla pitoisuudella ja suurin ulosteveden pienimmällä pitoisuudella (kuva 5). Fibroblasteilla tehdyssä kokeessa viabiliteetti oli kuitenkin samaa suuruusluokkaa ulosteveden 20 % ja 30 % pitoisuuksilla (kuva 5C).

5.3 Ulosteveden polyfenolimetaboliittien pitoisuudet loppupisteessä

Ulosteveden fenolisten happojen pitoisuudet määritettiin ainoastaan intervention loppupisteessä. Ulosteveden fenolisten happojen pitoisuudet on esitetty taulukossa 3. Fenolisten happojen pitoisuuksien vaihtelu näytteiden välillä oli suurta.

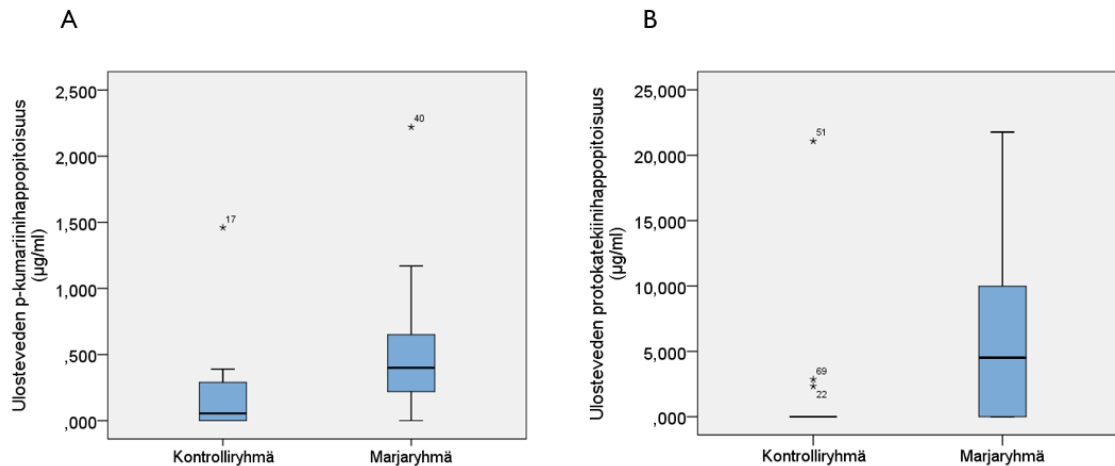
Taulukko 3. Ulosteveden fenolisten happojen pitoisuudet intervention loppupisteessä marjaryhmässä ja kontrolliryhmässä (keskiarvo \pm keskihajonta), $\mu\text{g/ml}$

	Marjaryhmä	Kontrolliryhmä	Ryhmien välinen ero Mann-Whitney U -testi p=
Ferulahappo	2,4 \pm 2	3,0 \pm 4,5	0,683
Protokatekiinihappo	6,1 \pm 7,4	1,64 \pm 5,3	0,027*
3,4diOHPPAA	3,6 \pm 6,9	2,0 \pm 5,1	0,495
Kahvihappo	1,5 \pm 3,8	2,1 \pm 6,0	0,138
p-Kumariinihappo	0,5 \pm 0,5	0,2 \pm 0,4	0,003*
Sinappihappo	0,1 \pm 0,4	0,1 \pm 0,2	0,868
Homovanilliinihappo	2,0 \pm 2,5	1,3 \pm 2,1	0,596
Vanilliinihappo	0,3 \pm 0,6	0,04 \pm 0,1	0,241
PCAglu	5,5 \pm 11,8	5,2 \pm 18,4	0,354
Kaikki yhteensä	14,6 \pm 11,7	9,2 \pm 11,1	0,101

*p-arvo < 0.05, 3,4diOHPPAA= 3,4-dihydroksifenyylietikkahappo PCAglu= protokatekiinihappo-3-glukuronidi

Marjaryhmän ulostevedestä mitattiin merkitsevästi suurempia pitoisuuksia protokatekiinihappoa ja p-kumariinihappoa kuin kontrolliryhmän ulostevedestä (kuva 6). p-Kumariinihapon pitoisuus oli intervention loppupisteessä kahdessa marjaryhmän

näytteessä (2/20) ja kahdeksassa kontrolliryhmän näytteessä (8/16) alle pienimmän määrittystason. Protokatekiinihapon pitoisuudet olivat alle määrittystason marjaryhmästä kahdeksalla (8/21) ja kontrolliryhmästä kolmellatoista tutkittavalla (13/16).



Kuva 6. A: Ulosteveden p-kumariinihapon pitoisuus (µg/ml) marjaryhmässä ja kontrolliryhmässä intervention loppupisteessä. Ryhmien välinen ero $p=0.003$ (Mann-Whitney U -testi) B: Ulosteveden protokatekiinihapon pitoisuus (µg/ml) marjaryhmässä ja kontrolliryhmässä intervention loppupisteessä. Ryhmien välinen ero $p=0.027$ (Mann-Whitney U -testi). Kuvissa suorakaiteen sisään sijoittuu 50 % havainnoista, ja poikkiviiva osoittaa mediaanin paikan. Janojen päät vastaavat pienintä ja suurinta arvoa. Poikkeavat havainnot on merkitty kyseessä olevan näytteen tutkimusnumerolla.

5.4 Ulosteveden polyfenolimetaboliittien pitoisuuksien yhteys solujen viabiliteettiin

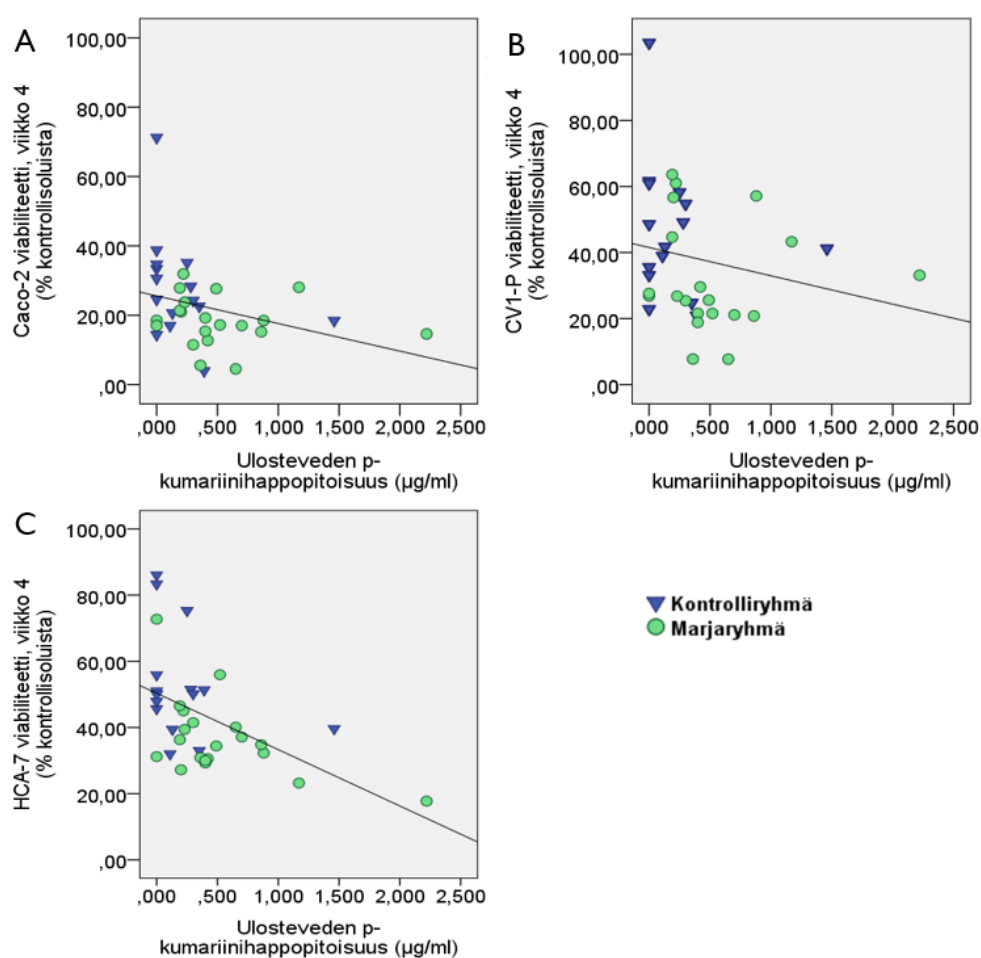
Ulosteveden polyfenolimetaboliittien pitoisuuksien ja solujen viabiliteetin välisiä toistuvia merkitseviä korrelaatioita on esitetty taulukossa 4. Ulosteveden p-kumariinihapon pitoisuudella ja solujen viabiliteetilla oli tilastollisesti merkitsevä käänteinen yhteys kaikissa solulinjoissa, kun ulosteveden pitoisuus oli 20 % tai 30 % (kuva 7). Lisäksi HCA-7 -solujen viabiliteetilla ja ulosteveden kahvihapon pitoisuudella oli merkitsevä käänteinen yhteys, kun ulosteveden pitoisuus oli 10 % tai 20 %. Myös yksittäisiä merkitseviä yhteyksiä löytyi; Caco-2 -solujen viabiliteetilla oli 30 % ulostevedellä tehdyssä kokeessa käänteinen yhteys 3,4-dihydroksifenyylietikkahapon ja vanilliinihapon pitoisuuteen, ja 20 % ulostevedellä tehdyssä kokeessa myös mitattujen fenolisten happojen yhteenlaskettuun pitoisuuteen. Aineistosta löytyi myös yksi

merkittävä suora yhteys; ulosteveden sinappihappopitoisuus ja HCA-7 solujen viabiliteetti korreloivat keskenään positiivisesti, kun ulosteveden pitoisuus on 30 %.

Taulukko 4. Solujen viabiliteetin yhteys ulosteveden p-kumariinihapon ja kahvihapon pitoisuuksiin koko aineistossa intervention loppupisteessä.

	CV1-P			HCA-7			Caco-2		
Ulosteveden pitoisuus	10 %	20 %	30 %	10 %	20 %	30 %	10 %	20 %	30 %
p-Kumariini-happo	-	R=-0,407 p=0.015	R=-0,417 p=0.013	-	R=-0,343 p=0.044	R=-0,504 p=-0.002	-	R=-0,414 p= 0.013	R=-0,466 p=0.005
Kahvihappo	-	-	-	R=-0,41 p=0.013	R=-0,382 p=0.023	-	-	-	-

Spearmanin korrelaatiotesti



Kuva 7. Viabiliteetin ja ulosteveden p-kumariinihapon pitoisuuden välinen korrelaatio koko aineistossa, kun laimennetun näytteen ulostevesipitoisuus oli 30 %. A: Caco-2 R=-0,417 p=0.013 B: CV1-P-2 R=-0,466 p=0.005 C: HCA-7, R=-0,504 p=-0.002 (Spearmanin korrelaatiotesti)

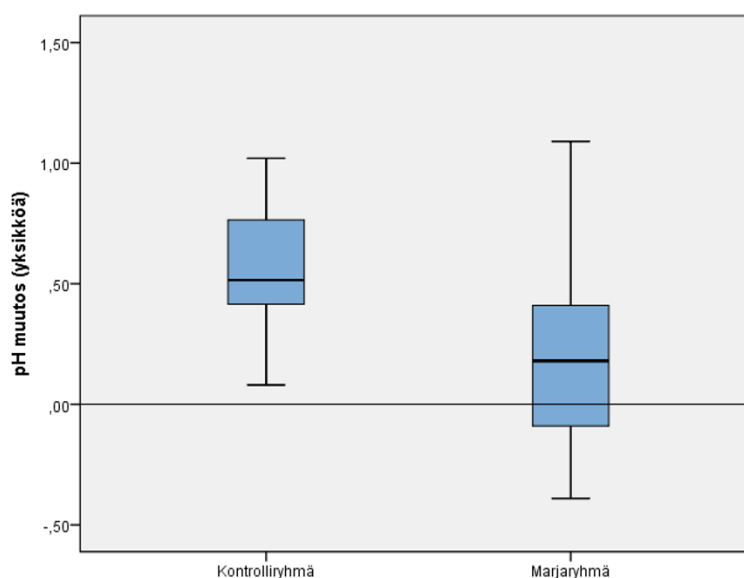
5.5 Ulosteveden happamuus (pH)

Marjoja sisältävän ruokavalion suuremman kuitu- ja polyfenolipitoisuuden arveltiin voivan vaikuttaa suolen sisällön happamuuteen, joten ulosteveden pH:n mahdollista yhteyttä saatuihin tuloksiin haluttiin tutkia. Intervention loppupisteessä ryhmien ulosteveden pH-arvot olivat keskimäärin samalla tasolla, mutta molemmissa ryhmissä keskimäärin korkeampia kuin lähtötilanteessa (taulukko 5). Muutos oli suurempi kontrolliryhmässä (kuva 8). Ulosteveden pH ei ollut yhteydessä minkään solulinjan viabiliteettiin.

Taulukko 5. Ulosteveden pH marjaryhmässä ja kontrolliryhmässä sekä ryhmien eroavuus intervention viikolla 0 ja viikolla 4 (keskiarvo \pm keskihajonta)

	Viikko 0			Viikko 4		
	keskiarvo	min	max	keskiarvo	min	max
Marjaryhmä	6,9 \pm 0,6	5,5	7,8	7,2 \pm 0,6	6,1	8,2
Kontrolliryhmä	6,6 \pm 0,4	5,8	7,6	7,1 \pm 0,4	6,7	8,0
Ryhmien välinen ero	p=0.021*			p=1.000*		

*Mann-Whitney U -testi



Kuva 8. Ulosteveden pH:n muutos marjaryhmässä ja kontrolliryhmässä intervention alkupisteestä loppupisteeseen. Vertailun helpottamiseksi kuvaan on asetettu vaakaviiva kohtaan, jossa pH:n muutos on 0. Suorakaiteen sisään sijoittuu 50 % havainnoista, ja poikkiviiva vastaa mediaania.

Janojen päät vastaavat pienintä ja suurinta arvoa. Ulosteveden pH:n muutos oli kontrolliryhmässä merkitsevästi suurempi ($p=0,038$, Mann-Whitney U -testi).

Ulosteveden pH-arvo ei ollut yhteydessä p-kumariinihapon pitoisuuteen, mutta pH:lla oli merkitsevä käänteinen yhteys kahvihapon, ferulahapon ja dihydroksifenyylietikkahapon pitoisuuksiin (taulukko 6).

Taulukko 6. Ulosteveden fenolisten happojen pitoisuuksien ja pH:n väliset merkitsevät korrelaatiot koko aineistossa intervention loppupisteessä.

	Korrelaatiokerroin	p-arvo
Kahvihappo	R= -0,509	p= 0.005
Ferulahappo	R= -0,562	p= 0.002
3,4-dihydroksi- Fenyylietikkahappo	R= -0,540	p= 0.002
Spearmanin korrelaatiotesti		

6 Pohdinta

6.1 Tutkimuksen tavoitteet ja lopputulos

Marjat ja marjojen polyfenolit vähentävät paksusuolisyöpäsolujen kasvua soluviljelmissä, mutta todellisuudessa paksusuolen solut eivät todennäköisesti altistu suurille pitoisuuksille marjojen alkuperäisiä polyfenoleja. *In vitro* suolistomikrobeilla käsitellyt marjat ovat aiemmissa tutkimuksissa vaikuttaneet solujen kasvuun ristiriitaisin tuloksin (Coates ym. 2007, Brown ym. 2012, Correa-Betanzo ym. 2014), eikä solualtistuskokeita marjojen todellisilla *in vivo* -metaboliittien seoksilla ja pitoisuuksilla ole aiemmin tehty. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tutkia, miten marjojen säännöllinen runsas nauttiminen vaikuttaa ulosteveden kykyyn vähentää paksusuolisyöpäsolujen ja fibroblastien viabiliteettia soluviljelmässä. Lisäksi tutkittiin, onko marjoista ruoansulatuksessa muodostuvien fenolisten happojen pitoisuuksilla yhteyttä solujen viabiliteettiin. Neljän viikon intervention jälkeen marjoja 200 g päivässä syöneen ryhmän ulostevesinäytteet vähensivät kaikkien tutkittujen solujen viabiliteettia enemmän kuin kontrolliryhmän näytteet, ja näytteissä oli merkitsevästi suurempia pitoisuuksia protokatekiinihappoa ja p-kumariinihappoa. Viabiliteetilla ja p-kumariinihapon pitoisuudella oli merkitsevä käänteinen yhteys. Näiden tulosten perusteella marjojen syönti mahdollisesti muuttaa ulosteen koostumusta ja marjojen paksusuolisyöpäsolujen kasvua vähentävä vaikutus voi ulottua koko ruoansulatuskanavan alueelle.

6.2 Solujen viabiliteetti

Altistuskokeen ajaksi sekä koesolujen että kontrollisolujen kasvatusliuokseen lisättiin hyvin vähän seerumia (1 %), minkä tarkoituksena oli pysäyttää solujen jakautuminen ja tarkastella ulostevesinäytteiden vaikutusta solujen elossa pysymiseen. Kasvainsolut eivät kuitenkaan ole samalla tavalla riippuvaisia kasvutekijöistä kuin normaalit solut. Käytetyllä menetelmällä määritetty viabiliteetti kertoo solujen suhteellisen määrän kontrollisoluihin nähden, mutta se ei kuvaa erikseen solunjakautumisten ja solukuolemien osuutta. Alle sadan prosentin viabiliteetti tarkoittaa, että solut ovat jakautuneet vähemmän kuin kontrollisolut ja / tai soluista suurempi osa on kuollut.

Muutamaa yksittäistä poikkeusta lukuun ottamatta kaikki tämän tutkimuksen ulostevesinäytteet kaikilla laimennoksilla vähensivät solujen viabiliteettia. Aiemman tutkimuksen perusteella ulostevesi lisää apoptoosia HT-29 -paksusuolisyöpäsoluilla, ja apoptoosiin siirtyneet solut irtoavat kasvatusalustasta (Haza ym. 2000). Mikroskooppitarkastelun perusteella myös tämän työn altistuskokeissa soluja irtosi runsaasti kasvatusalustasta etenkin ulosteveden 20 % ja 30 % laimennoksilla, joten todennäköisesti apoptoosi selittää ainakin osan solujen viabiliteetin vähenemisestä. Kuitenkin mikroskooppitarkastelussa näkyi myös paisuneita soluja, mikä voi olla merkki solun hallitsemattomasta kuolemasta eli nekroosista (Elmore 2007). Nekroosissa solu hajoaa ja aiheuttaa inflammatiota kudoksessa, eikä siitä siksi ajatella olevan hyötyä syövän ehkäisyssä. Ulosteveden rasvaliukoisten yhdisteiden on toisaalta osoitettu lisäävän HCT-116 -paksusuolisyöpäsolujen jakautumista (Nordling ym. 2003), ja joidenkin fenolisten happojen muun muassa vähentävän kasvutekijäreseptorien määrää solukalvolla (Roy ym. 2016). Yksilölliset erot ulosteveden koostumuksessa ovat siten voineet vaikuttaa apoptoosiin ja nekroosiin lisäksi myös solujen jakautumisaktiivisuuteen. Ulostevesinäytteille altistettujen solujen määrä oli kuitenkin muutamaa yksittäistä poikkeusta lukuun ottamatta selvästi alle 100 % kontrollisolujen määrästä, joten todennäköisesti solujen jakautuminen ei merkittävässä määrin selitä saatuja tuloksia.

Syöpäsolut eivät ohjaudu apoptoosiin kuten normaalit solut (Alberts ym. 2008) ja siksi solututkimuksissa syöpäsolujen apoptoosiin käynnistymistä käytetään mahdollisen syövältä suojaavan vaikutuksen tutkimiseen. Syöpäsolut ovat myös normaaleista soluista poiketen pysyvästi jakautuvia (Alberts ym. 2008), ja siksi myös syöpäsolujen jakautumisen pysäyttämisen katsotaan kuvaavan mahdollista suojavaikutusta. Syövän ehkäisemisen kannalta on kuitenkin tärkeää, ettei syöpäsolujen kasvua häiritsevä tekijä edistä syöpämutaatioiden syntyä terveissä soluissa. Marjoilla, niiden polyfenoleilla tai metaboliiteilla ei tiedetä olevan genotoksisia tai muita syövän syntyä edistäviä vaikutuksia, vaan ne saattavat jopa estää mutaatioiden syntyä useiden eri mekanismien kautta (Afrin ym. 2016). Ulosteveden tiedetään sen sijaan voivan olla vaihtelevasti genotoksista (Erba ym. 2014). Tässä tutkimuksessa ulostevesinäytteiden genotoksisuutta ei testattu, eikä genotoksisuuden mahdollista vaikutusta voida poissulkea.

Aiemman tutkimuksen perusteella paksusuolisyöpäsolut saattavat olla normaaleja paksusuolisoluja herkempiä ulosteveden (Haza ym. 2000) ja marjojen polyfenolien apoptoottisille / jakautumista estäville vaikutuksille (Zhao ym. 2004, Correa-Betanzo ym.

2014). Tässä gradutyössä normaaliin solujen mallintamiseen käytettiin fibroblasteja, sillä morfologialtaan normaaleja paksusuolen epiteelisoluja ei ole saatavilla eikä niiden kasvattaminen solumaljalla olisi mahdollista. Fibroblastit eivät käyttäytyneet selvästi eri tavoin kuin kasvainsolut HCA-7 ja Caco-2, ja intervention loppupisteessä marjaryhmän ja kontrolliryhmän välinen ero oli merkitsevä kaikilla solulinjoilla. Fibroblasteja ei kuitenkaan voi suoraan rinnastaa paksusuolisoluihin, jotka muun muassa käyttävät ulosteveden butyraattia energianlähteenään. Lisäksi CV1-P on niin kutsuttu immortaali solulinja. Immortaali solut eivät normaaliin solujen tapaan lopeta jakautumistaan viljeltynä ja muistuttavat siten käyttäytymiseltään osittain syöpäsoluja (Freshney 2005). Lisäksi kaikkien solumaljalla kasvatettavien solujen energiametabolian muuttuu osittain kasvainsolujen energiametabolian kaltaiseksi, sillä diffuusioon perustuva hapenkuljetus ei riitä aerobisen respiraation normaalin tason ylläpitoon (Freshney 2005). Immortaali paksusuolisolut (NCM 460) ovat tästä huolimatta eräässä aiemmassa tutkimuksessa olleet paksusuolisyöpäsoluihin (HT-29) verrattuna vähemmän herkkiä mustikan, viinirypäleen ja marja-aronian polyfenoleille, mutta eivät kuitenkaan suurille pitoisuuksille altistettuna tai vain vuorokauden pituisen altistuksen jälkeen (Zhao ym. 2004). Tätä vasten tarkasteltuna on mahdollista, että lyhyt altistusaika, liian vahvat ulostevesialtisteet tai ulosteveden muiden yhdisteiden vaikutukset peittivät tässä gradutyössä kasvainsolujen ja fibroblastien välisen herkkyyseron.

6.3 Polyfenolimetaboliitit

Tässä tutkimuksessa marjoja syöneiden tutkittavien ulostevedestä mitattiin korkeampia pitoisuuksia protokatekiinihappoa ja p-kumariinihappoa, mutta muiden määritettyjen fenolisten happojen pitoisuudet tai niiden kokonaismäärä eivät merkitsevästi eronneet ryhmien välillä. Rotilla tehdyssä kokeessa antosyaanipitoisten marjauutteiden syöttäminen johti ulosteen korkeaan antosyaanipitoisuuteen, ulosteen massan ja vesipitoisuuden lisääntymiseen ja sappihappopitoisuuden pienenemiseen (Lala ym. 2006). Myös KarniMari-interventiossa marjojen syönti todennäköisesti lisäsi sekä ulosteen polyfenolimetaboliittien määrää että vesipitoisuutta, jolloin metaboliittien pitoisuus ulostevedessä on mahdollisesti muuttunut vähemmän kuin niiden määrä koko ulosteessa. Vesipitoisuuden nousu saattoi laimentaa myös esimerkiksi solujen kasvua lisäävien yhdisteiden, kuten sappihappojen tai tyypiyhdisteiden pitoisuutta.

Polyfenolimetaboliittien pitoisuudet määritettiin vain intervention loppupisteen ulostevesinäytteistä. Protokatekiinihappo on aiemman tutkimuksen perusteella antosyaanipitoisten marjojen yleinen metaboliitti suolistossa (Correa-Betanzo ym. 2014, Gill ym. 2010, Nurmi ym. 2009, Koli ym. 2010, Pimpão ym. 2015), mikä on linjassa tämän työn tulosten kanssa. Protokatekiinihapon pitoisuudella ei kuitenkaan ollut merkitsevää yhteyttä solujen viabiliteettiin. Tämäkin tukee aiempaa tutkimusta, jonka perusteella protokatekiinihappo ei vähennä paksusuolisyöpäsolujen (HT-29) kasvua kuten mustikka tai mustikan antosyaanit (Correa-Betanzo ym. 2014). Toisaalta protokatekiinihapon pitoisuus ulostevedessä voisi olla yhteydessä antosyaanien pitoisuuteen, mutta tästä huolimatta merkitsevää yhteyttä protokatekiinihapon ja solujen viabiliteetin väliltä ei löytynyt.

Myös p-kumariinihappoa on marjoissa vapaana ja muihin molekyyleihin sitoutuneena, mutta sitä esiintyy laajasti myös muissa kasvikunnan tuotteissa ja erityisen runsaasti useissa sienissä (Pei ym. 2016). Vaikka tässä tutkimuksessa p-kumariinihapon pitoisuus ulostevedessä oli pieni, oli se siitä huolimatta käänteisessä yhteydessä kaikkien solulinjojen viabiliteettiin. Osalla tutkittavista p-kumariinihappoa ei löydetty ulostevedestä lainkaan ja valtaosa heistä kuului kontrolliryhmään. Rotilla tehtyjen kokeiden perusteella vapaa p-kumariinihappo imeytyy nopeasti koko ruoansulatuskanavan alueella (Pei ym. 2016), joten ulostevedestä mitattu p-kumariinihappo on todennäköisesti peräisin paksusuoleen asti kulkeutuneista imeytymättömistä yhdisteistä, joista sitä vapautuu mikrobihajotuksen seurauksena. p-Kumariinihappoa sisältävien polyfenolien rakenne, suoliston mikrobisto ja suolen läpikulkuaika ovat osaltaan voineet vaikuttaa siihen, kuinka suuri osa ravinnon p-kumariinihaposta on jäljellä ulostevedessä.

Useissa tutkimuksissa p-kumariinihapolla on onnistuttu vähentämään paksusuolisyöpäsolujen kasvua (Roy ym. 2016, Jaganathan ym. 2013, Bouzaïene ym. 2015, Riaz ym. 2017, Janicke ym. 2005), mutta moninkertaisilla pitoisuuksilla tässä tutkimuksessa ulostevedestä mitattuihin pitoisuuksiin nähden. Pienin tutkittu p-kumariinihapon pitoisuus 2,4 µg/ml ei vaikuttanut Caco-2 -solujen viabiliteettiin (Janicke ym. 2005), ja pienin HT-29-D4 -soluihin tehonnut pitoisuus 8 µg/ml (Bouzaïene ym. 2015) ei tehonnut soluihin HT-29 ja HCT-15 (Jaganathan ym. 2013). Noin 50 % inhibiition aiheuttanut pitoisuus on ollut noin 160-240 µg/ml (Roy ym. 2016, Bouzaïene ym. 2015, Jaganathan ym. 2013). KarniMarin ulostevesinäytteistä mitattu korkein p-

kumariinihapon pitoisuus oli 2,2 µg/ml ja altistuskokeissa käytettyjen laimennosten pitoisuudet vain 10 %, 20 % tai 30 % tästä pitoisuudesta. Aiemmissa tutkimuksissa myös kahvihapolla ja ferulahapolla on ollut vastaavia solujen kasvua vähentäviä vaikutuksia (Janicke ym. 2005, Bouzaiene ym. 2015, Roy ym. 2016), mutta tässä gradutyössä vain p-kumariinihapon pitoisuudella oli merkitsevä käänteinen yhteys kaikkien solulinjojen viabiliteettiin. Kahvihapolla ja HCA-7-solujen viabiliteetilla oli käänteinen yhteys ulosteveden 10 % ja 20 % laimennoksilla. Eräässä tutkimuksessa on kuitenkin havaittu, että p-kumariinihapon glukoosikonjugaatti (1-O-hydroksisinnamoyyliglukoosi) rajoitti HCT116-solujen jakautumista tehokkaammin kuin p-kumariinihapo, ja tällä yhdisteellä 4 µg/ml tuotti 42 % inhibiition (Riaz ym. 2016). Ulostevessä saattaakin olla yhdisteitä, jotka vähentävät solujen viabiliteettia pienempinä pitoisuuksina kuin vapaa p-kumariinihapo. On myös mahdollista, että ulosteveden fenolisilla hapoilla ja muilla yhdisteillä on yhteisvaikutuksia, jolloin ulostevedelle altistettut solut saattavat reagoida pienempiin p-kumariinihapon pitoisuuksiin kuin yksittäiselle yhdisteelle altistettut solut.

6.4 Ulosteveden happamuus (pH)

Polyfenoleja on runsaasti kuitupitoisessa ravinnossa, ja siksi ruokavaliointerventioissa kuidun ja polyfenolien itsenäisiä vaikutuksia on vaikea tutkia. Myös KarniMari-interventiossa kuidun saanti oli runsaampaa marjaryhmässä kuin kontrolliryhmässä (Aittola 2016). Viabiliteetin ero ryhmien välillä voisi siis selittyä jollakin kuitupitoisen ravinnon vaikutuksella, joka ei välttämättä liity ulostevedestä mitattujen fenolisten happojen pitoisuuksiin. Kuidun saannilla ja viabiliteetilla olikin merkitsevä käänteinen yhteys, mutta kuidun saanti ei kuitenkaan ollut yhteydessä ulosteveden p-kumariinihapon pitoisuuteen tai ulosteveden happamuuteen. Lähtötilanteessa kontrolliryhmän ulosteveden pH oli merkitsevästi matalampi kuin marjaryhmässä. Jostakin tuntemattomasta syystä ulosteveden pH nousi molemmissa ryhmissä lähtötilanteeseen nähden, kuitenkin marjaryhmässä tämä muutos oli pienempi kuin kontrolliryhmässä. Olisi syytä selvittää, voisiko tässä interventiossa käytetty suurehko päivittäinen annos sianlihatuotteita vähentää ulosteveden happamuutta. On myös mahdollista, että marjojen syömisestä pidättyminen vähensi kontrolliryhmän polyfenolien saantia lähtötilanteeseen nähden, sillä marjat ovat merkittävä polyfenolien lähde suomalaisilla. Tämä voisi selittää kontrolliryhmän suurempaa ulosteveden pH:n muutosta.

Fenoliset hapot ovat heikkoja happoja, jotka voisivat teoriassa puskuroida ulosteveden pH:n muutoksia. Tämä voisi selittää sitä, miksi marjaryhmän runsaammasta kuidunsaannista huolimatta interventioryhmien ulosteveden pH-arvot olivat intervention jälkeen samalla tasolla. Marjojen polyfenolimetaboliittien vaikutusta ulosteveden pH-puskurikykyyn voisi tutkia tarkemmin, sillä ulosteveden pH-arvolla saattaa olla merkitystä paksusuolisyövän riskin kannalta (De Kok ym. 1999, Haza ym. 2000, Ohigashi ym. 2013).

6.5 Tutkimuksen virhelähteet

Intervention ja solututkimuksen yhdistämisen vuoksi tämän tutkimuksen tuloksiin ovat voineet vaikuttaa kummallekin menetelmälle tyypilliset virhelähteet. Ruokavaliointervention haasteita ovat muun muassa otannan ja satunnaistamisen onnistuminen, ruokavaliodien toteutuminen sekä tutkittavien poisjäänti tutkimuksen aikana. KarniMari-tutkimuksessa interventioryhmien ruokavaliot toteutuivat hyvin ruoankäyttötietojen sekä ulosteveden polyfenolimetaboliittien ja tyypiyhdisteiden pitoisuuksien perusteella arvioituna (Aittola 2016). Ryhmien välillä ei ennen tutkimusta havaittu merkitseviä eroja taustatekijöissä tai ravinnonsaannissa (Aittola 2016), joten myös satunnaistamista voidaan pitää onnistuneena. Toisaalta ulosteveden happamuudessa oli merkitsevä ero ryhmien välillä ennen interventiota, joten ryhmien riittävästä samankaltaisuudesta esimerkiksi suoliston mikrobiston suhteen ei voida olla varmoja. Lisäksi kahden tutkittavan keskeyttäminen sekä muutaman paksun ulostevesinäytteen suodatuksen epäonnistuminen pienensivät kontrolliryhmän kokoa. Paksut ulostevesinäytteet ovat todennäköisesti olleet koostumukseltaan poikkeavia.

Ulosteveden tutkiminen on uusi menetelmä niin ravitsemustutkimuksessa kuin syöpätutkimuksessakin. Soluviljelmässä parhaiten suolen ontelon olosuhteita kuvaavaa ulosteveden vahvuutta tai altistuksen kestoa ei tunneta. Kuten ulosteesta määritetty mikrobiprofiiliin ei anna tarkkaa kuvaa mikrobiston koostumuksesta suolen epiteelillä, eivät ulosteen muutkaan ominaisuudet todennäköisesti kerro koko totuutta suoliston eri osien olosuhteista. Ulosteveden eristämiseksi ulostenäytettä on homogenoitava, jolloin imeytymättä jääneestä aineksesta saattaa liueta aineita, jotka todellisuudessa eivät ole olleet tekemisissä suolen epiteelin kanssa. Esimerkiksi tässä tutkimuksessa syötyjen

marjojen kuorista on homogenoinnin ansiosta saattanut vapautua fenolisia happoja, jolloin eristetyistä ulostevedestä määritetyt fenolisten happojen pitoisuudet ovat voineet olla todellista suurempia.

Soluviljely on tutkimusmenetelmänä aina jonkin verran epätarkkaa, sillä tasaisen solususpension valmistaminen ja pipetointi on haastavaa ja siten myös istutettujen koesolujen määrässä on aina vaihtelua. Tämä vaihtelu solumäärässä pyrittiin huomioimaan tekemällä kolme rinnakkaisaltistusta jokaisen näytteen jokaisella kolmella laimennoksella. Soluviljelyssä tuloksiin voi vaikuttaa tutkijan käsiala, ja tässä tutkimuksessa se on myös voinut muuttua tutkimuksen aikana menetelmien hallinnan kehittyessä. Tämän vuoksi tutkimuksen alussa tehdyt altistukset uusittiin tutkimuksen myöhemmässä vaiheessa. Tätä tutkimusta varten osa aineistosta oli kerätty etukäteen (altistuskokeet loppupisteen näytteillä solulinjoilla HCA-7 ja Caco-2, Maija Määttänen HY), minkä vuoksi tutkijoiden väliset erot ovat voineet vaikuttaa tuloksiin. Laboratoriossa kasvatettavissa solulinjoissa saattaa myös tapahtua solujen valikoitumista viljelyn aikana, minkä vuoksi soluviljelmän käyttäytyminen voi muuttua tutkimuksen edetessä (Freshney 2005b). Tässä työssä kaikki solukokeet suunniteltiin kuitenkin siten, että edellä mainitut tekijät eivät vaikuttaisi ryhmien välisen eron tutkimiseen.

CCK-8 -reagenssin käyttö solumäärän määrittämisessä perustuu solujen dehydrogenaasientsyymin aktiivisuuteen, ja tämän entsyymin toimintaan vaikuttavat tekijät tai reagenssia pelkistävät yhdisteet voivat häiritä määrittystä (Sigma Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/96992dat.pdf>, viitattu 29.04.2018). Ulostevesi solumaljalla määrittämisessä on ongelmallista, sillä kaikkia näytteissä esiintyviä yhdisteitä ei tunneta. Tulosten luotettavuuden arvioimiseksi tutkittiin ulosteveden ja reagenssin interaktiota ilman soluja kuudella alkupisteen näytteellä (liite 3, kuva 12). Osa näytteistä tuotti suhteellisen pienen absorbanssin muutoksen, mutta osalla tulos oli solujen tuottaman absorbanssin muutokseen nähden merkittävä. Solujen aineenvaihdunnalla on kuitenkin todennäköisesti ollut oma vaikutuksensa ulostevettä sisältävän liuoksen pelkistyskykyyn ja siten reagenssin värinmuutokseen, eikä todellisen interaktion suuruuteen altistuskokeen aikana päästy luotettavasti käsiksi jälkikäteen. Solujen viabiliteettia tulkittaessa on huomioitava, että tämä interaktio on saattanut vääristää tuloksia suuntaan tai toiseen.

Polyfenolien antioksidatiivisuuden vuoksi ulosteveden pelkistyspotentiaali voisi teoriassa olla suurempi marjoja syöneillä kuin kontrolleilla. Tässä tapauksessa ulosteveden ja reagenssin interaktio olisi häivyttänyt interventioryhmien välistä eroa ulostevedelle altistettujen solujen viabiliteetissa. Aiemmin tehdyssä tutkimuksessa marjojen polyfenolien antioksidatiokyky kuitenkin hävisi ruoansulatuksen simulaatiossa *in vitro* (Correa-Betanzo ym. 2014), mutta marjoista *in vivo* -olosuhteissa muodostuvien suolistometaboliittien vaikutusta ulosteveden antioksidatio- tai pelkistyskykyyn ei ole tutkittu. Tässä gradututkimuksessa tehdyn ulosteveden ja CCK-8 -reagenssin interaktion testauksessa kävi ilmi, että juuri pakasteesta sulatettu ulostevesi pelkisti reagenssia huomattavasti enemmän kuin vuorokauden ajan kuoppalevyllä kasvatuskaapissa ollut ulostevesi. Tämän perusteella ulosteveden pelkistyskyvyllä saattaa olla jopa suurempi merkitys suolen lumenissa *in vivo* kuin tämän kokeen soluviljelmässä *in vitro*. Ulostevden pelkistyskyky voisi vaikuttaa esimerkiksi ulosteveden genotoksisuuteen, mikä ei välttämättä näkyisi viabiliteetin mittaukseen perustuvassa koeasetelmassa. Tulokset antavat aihetta ilmiön tarkempaan tutkimiseen.

6.6 Tuloksien yleistettävyys

KarniMari-tutkimukseen rekrytoitut tutkittavat edustavat perustervettä työikäistä suomalaisväestöä. Tuloksia ei siten voida yleistää koskemaan muita väestöryhmiä.

Soluviljelmä eroaa monin tavoin todellisesta kudoksesta *in vivo*, eikä yksin solututkimuksista saatujen tuloksien perusteella voida koskaan vetää suoria johtopäätöksiä elimistön toiminnasta. Soluviljelmässä kasvavilla paksusuolisoluilla ei ole vuorovaikutusta kudoksen muiden solujen, elimistön tai suoliston mikrobiston kanssa, eikä niillä ole suojaavaa limakerrosta tai elimistön immuunijärjestelmää. Solumaljalla kasvatettavien solujen energiametabolia on glykolyysipainotteista, sillä diffuusioon perustuva hapen kuljetus ei riitä aerobisen respiraation normaalin tason ylläpitämiseen (Freshney 20005). Tämä saattaa peittää kasvainsolujen ja tavallisten solujen herkkyseron, mikäli herkkyyteen liittyy syöpäsolujen muuttunut energiametabolia (Warburg 1956). Lisäksi solumaljalla ulostevesinäytteen pitoisuus on vakio kokeen ajan, kun taas suolessa solut todennäköisesti altistuvat etenevän ulostemassan yhdisteille jaksoittain vaihtelevina pitoisuuksina.

6.7 Tutkimuksen vahvuudet

Ruokavaliointervention ja solututkimuksen yhdistelmää ei ole aiemmin hyödynnetty marjojen ja paksusuolisyövän välisen yhteyden tutkimisessa. Tutkimukseen liittyi paljon mahdollisia virhelähteitä, jotka huomioitiin kattavasti tutkimuksen suunnittelussa, toteutuksessa ja tuloksien tulkinnassa.

Tässä solukokeessa käytettiin useilta eri tutkittavilta saatuja todellisia ulostevesinäytteitä keinotekoisien suolistomikrobeilla *in vitro* -fermentoitujen marjauutteiden sijaan (Coates ym. 2007, Brown ym. 2012, Correa-Betanzo ym. 2014), jolloin jokaisen tutkittavan yksilöllinen ruokavalio, aineenvaihdunta ja suoliston mikrobisto ovat osaltaan olleet mukana vaikuttamassa ulosteveden kemialliseen koostumukseen. Lisäksi päivittäinen marja-annos intervention aikana oli realistinen ja toteutettavissa ilman erityisvalmisteita, toisin kuin aiemmissa marjainterventioissa (Wang ym. 2011, Wang ym. 2014).

Solukokeen huomionarvoinen vahvuus oli myös kolmen solulinjan tutkiminen, sillä eri solulinjojen välillä voi olla suuriakin herkkyyseroja. Tämä solukoe on ensimmäinen koskaan tehty tutkimus, jossa paksusuolisyöpäsoluja on altistettu marjoista *in vivo* muodostuville metaboliiteille.

7 Johtopäätökset

Marjoja syöneiden tutkittavien ulostevesi vähensi neljän viikon intervention jälkeen sekä kasvainsolujen että fibroblastien viabiliteettia enemmän kuin kontrolliryhmän ulostevesi. Marjojen syönti tuotti ulosteveteen suurempia protokatekiinihapon ja p-kumariinihapon pitoisuuksia. Solujen viabiliteetilla ja p-kumariinihapon pitoisuudella oli merkitsevä käänteinen yhteys kaikissa solulinjoissa, kun ulosteveden pitoisuus oli 20 % tai 30 %. p-Kumariinihappo voi vähentää solujen viabiliteettia itsenäisesti tai yhteisvaikutuksena yhden tai useamman ulostevedessä esiintyvän tekijän kanssa, tai olla yhteydessä johonkin toistaiseksi tuntemattomaan vaikuttavaan tekijään ulostevedessä. Marjojen syönti saattoi muuttaa mm. mikrobiston koostumusta, ulosteen vesipitoisuutta ja suolen läpikulkuaikaa, vaikuttaen myös sitä kautta ulosteveden koostumukseen. Tässä tutkimuksessa fibroblastit käyttäytyivät ulostevedelle altistettuna samankaltaisesti kuin paksusuolisyöpäsolut. Jatkotutkimuksissa tulisi selvittää, vaikuttaako marjoja runsaasti syövien ulostevesi johonkin syöpäsoluja ja immortaaleja fibroblasteja yhdistävään ominaisuuteen, tai onko se mahdollisesti kaikille soluille haitallista. Marjojen syönti kuitenkin näyttäisi pienentävän paksusuolisyövän riskiä tähänastisen tutkimusnäytön perusteella. Marjoja runsaasti syövien ulostevesi saattaa vähentää syöpämuutoksia saavuttaneiden solujen jakautumista tai elossa pysymistä, tai vaihtoehtoisesti toksisempi ulostevesi voi vaikuttaa syöpäriskiin esimerkiksi suoliston mikrobiston muutosten kautta.

Kiitokset

Haluan suuresti kiittää ohjaajiani Anne-Maria Pajaria sekä Essi Päivärintaa kaikesta siitä kannustamisesta, innostamisesta ja kärsivällisyydestä, mitä tämän työn loppuun saattamiseksi tarvittiin. Lämpimät kiitokseni ansaitsee myös Anu Heiman-Lindh, joka on ollut minulle korvaamaton tuki laboratoriotyöskentelyn joskus yllättävissäkin käänteissä.

Kiitän myös perhettäni ja kaikkia ystäviäni, jotka ovat tukeneet minua opintojeni ajan. Suurimmat kiitokseni omistan rakkaalle Harrille, joka uskoo minuun enemmän kuin minä itse.

Lähdeluettelo

- Afrin S, Giampieri F, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Varela-López A, Quiles JL, Mezzetti B and Battino M. Chemopreventive and Therapeutic Effects of Edible Berries: A Focus on Colon Cancer Prevention and Treatment. *Molecules* 2016; 21:169
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Walter P. *Cancer. Kirjassa: Molecular Biology of The Cell*. Garland Science 2008 s.1205-1268
- Auger C, Mullen W, Hara Y, Crozier A. Bioavailability of polyphenon E flavan-3-ols in humans with an ileostomy. *J Nutr* 2008; 138:1535S-1542S.
- Aura AM, Martin-Lopez P, O'Leary KA, Williamson G, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K, Santos-Buelga C. In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur J Nutr* 2005; 44:133-42
- Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, Zehnbauser BA, Hamilton ST, Jones RJ. Inhibition of Apoptosis during Development of Colorectal Cancer. *American Association for Cancer Research* 1995; 55:1811-1816
- Bishayee A, Haskell Y, Do C, Siveen KS, Mohandas N, Sethi G, Stoner GD. Potential Benefits of Edible Berries in the Management of Aerodigestive and Gastrointestinal Tract Cancers: Preclinical and Clinical Evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016; 56:1753-75
- Brown EM, Nitecki S, Pereira-Caro G, McDougall GJ, Stewart D, Rowland I, Crozier A, Gill CIR. Comparison of in vivo and in vitro digestion on polyphenol composition in lingonberries: Potential impact on colonic health. *BioFactors* 2014; 40:611-623
- Brown EM, McDougall GJ, Stewart D, Pereira-Caro G, González-Barrio R, Allsopp P, Magee P, Crozier A, Rowland I, Gill CI. Persistence of anticancer activity in berry extracts after simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Plos one* 2012; 7:e49740
- Burkitt DP. Related disease--related cause? *Lancet*. 1969; 2(7632):1229-31
- Burns MB, Lynch J, Starr TK, Knights D, Blekhman R. Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment. *Genome Med* 2015; 7:55
- Boateng ym. Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in fisher 344 male rats. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:725-32
- Bostick RM, Fosdick L, Grandits GA, Lillemoe TJ, Wood JR, Grambsch P, Louis TA, Potter JD. Colorectal Epithelial Cell Proliferative Kinetics and Risk Factors for Colon

Cancer in Sporadic Adenoma Patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:1011-9

Bouzaïene NN, Jaziri SK, Kovacic H, Chekir-Ghedira L, Ghedira K, Luis J. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *Eur J Pharmacol* 2015; 766:99-105

Cerdá B, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem* 2005; 53:227-35

Chang WC, Chapkin RS, Lupton JR. Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1997; 18:721-730

Coates E, Popa G, Gill C, McCann M, McDougall G, Stewart D, Rowland I. Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *J Carcinog* 2007; 6:1–10.

Cooke D, Schwarz M, Boocock D, Winterhalter P, Steward WP, Gescher AJ, Marczyklo TH. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis--relationship with tissue anthocyanin levels. *Int J Cancer*. 2006; 119:2213-20

Correa-Betanzo J, Allen-Vercoe E, McDonald J, Schroeter K, Corredig M, Paliyath G. Stability and biological activity of wild blueberry (*vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chem* 2014; 165:522-31

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*. 2009; 26:1001-43

Dall'Asta M, Calani L, Tedeschi M, Jechiu L, Brighenti F, Del Rio D. Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition* 2012; 28:197–203

Derry MM, Raina K, Agarwal C, Agarwal R. Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Front Oncol* 2013; 3:119

Dolara P, Caderni G, Salvadori M, Morozzi G, Fabiani R, Cresci A, Orpianesi C, Trallori G, Russo A, Palli D. Fecal Levels of Short-Chain Fatty Acids and Bile Acids as Determinants of Colonic Mucosal Cell Proliferation in Humans. *Nutr Cancer* 2002; 42:186-90

Erba D, Soldi S, Malavolti M, Aragone G, Alexandra M, Vinoy S, Casiraghi MC. Fecal water genotoxicity in healthy free-living young Italian people. *Food Chem Toxicol* 2014; 64:104-9

Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516

Fearon E. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2011; 6:479-507

Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr* 2006; 45:7-18

Freshner, RI. Biology of cultured cells. Kirjassa: Freshner, RI. Culture of Animal cells: a Manual of Basic Technique. John Wiley & sons, inc. 2005

Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Battino M. Strawberry and human health: effects beyond antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 3867-3876

Gill C, McDougall G, Glidewell S ym. Profiling of phenols in human fecal water after raspberry supplementation. *J Agric Food Chem* 2010; 58:10389-95

González-Barrio R, Edwards C, Crozier A. Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: in vivo and in vitro studies. *Drug metab dispos* 2011; 39:1680-8

González-Barrio R, Borges G, Mullen W, Crozier A. Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *J Agric Food Chem* 2010; 58:3933-9

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74

Haza AI, Glinghammar B, Grandien A, Rafter J. Effect of colonic luminal components on induction of apoptosis in human colonic cell lines. *Nutr Cancer* 2000;36:79-89

Jaganathan SK, Supriyanto E, Mandal M. Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 7726-7734

Janicke B, Önning G, Oredsson SM. Differential Effects of Ferulic Acid and p-Coumaric Acid on S Phase Distribution and Length of S Phase in the Human Colonic Cell Line Caco-2. *J Agric Food Chem* 2005; 53:6658-6665

- Kahle K, Kraus M, Scheppach W, Ackermann M, Ridder F, Richling E. Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Mol Nutr Food Res* 2006;50:418-23
- Keppler K, Humpf HU. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem* 2005; 13:5195-205
- de Kok TM, van Faassen A, Glinghammar B, Pachen DM, Eng M, Rafter JJ, Baeten CG, Engels LG, Kleinjans JC. Bile Acid Concentrations, Cytotoxicity, and pH of Fecal Water from Patients with Colorectal Adenomas. *Dig Dis Sci* 1999; 44:2218-25
- Koli R, Erlund I, Jula A, Marniemi J, Mattila P, Alfthan G. Bioavailability of various polyphenols from a diet containing moderate amounts of berries. *J Agr Food Chem* 2010;58:3927-3932
- Koponen JM, Happonen AM, Mattila PH, Törrönen AR. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 1612-1619
- Kottra G, Daniel H. Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:829-35
- Lala G, Malik M, Zhao CW, He J, Kwon Y, Giusti MM, Magnuson BA. Antocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutr cancer* 2006; 54:84-93
- Loo J, Watzl B, Collins JK. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2007 Feb;85(2):488-96
- Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M, Tsuda T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyaniding 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J Agric Food Chem* 2001; 49:1546-51
- Mecklin JP, Malila N, Kääriäinen H, Pajari AM, Färkkilä M. Suolistosyövän riskitekijät ja ehkäisyn mahdollisuudet. *Duodecim* 2016;132:1145-52
- Mentor-Marcel RA, Bobe G, Sardo C, Wang LS, Kuo CT, Stoner G, Colburn NH. Plasma Cytokines as Potential Response Indicators to Dietary Freeze-Dried Black Raspberries in Colorectal Cancer Patients. *Nutr Cancer* 2012; 64:820-825.
- Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Slatnar A, Stampar F, Veberic R.A. Comparison of fruit quality parameters of wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) growing at different locations. *J Sci Food Agric* 2015; 95:776-85

- Monleón D, Morales JM, Barrasa A, López JA, Vázquez C, Celda B. Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR Biomed* 2009; 22:342-348
- Moser AR, Luongo C, Gould KA, McNeley MK, Shoemaker AR, Dove WF. ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur J Cancer* 1995;31:1061-4
- Mutanen M, Pajari AM, Päivärinta E, Misikangas M, Rajakangas J, Marttinen M, Oikarinen S. Berries as Chemopreventive dietary constituents – a mechanistic approach with the apcMin/+ mouse. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008; 17:S123-S125
- Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Mattila PH, González-Paramás AM, Törrönen AR. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *J Agric Food Chem* 2004a; 52:4477-86
- Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *J Agric Food Chem* 2004b; 52:6178-87
- Núñez-Sánchez MA, González-Sarriás A, Romo-Vaquero M, García-Villalba R, Selma MV, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Dietary phenolics against colorectal cancer--From promising preclinical results to poor translation into clinical trials: Pitfalls and future needs. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59:1274-91
- Nurmi T, Mursu J, Heinonen M, Nurmi A, Hiltunen R, Voutilainen S. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *J Agric Food Chem* 2009; 57:2274-81
- Nordling MM, Glinghammar B, Karlsson PC., De Kok TMCM, Rafter JJ. Effects on cell proliferation, activator protein-1 and genotoxicity by fecal water from patients with colorectal adenomas. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38:549-555.
- Ohigashi S, Sudo K, Kobayashi D, Takahashi O, Takahashi T, Nomoto K, Onodera H. Changes of the Intestinal Microbiota, Short Chain Fatty Acids, and Fecal pH in Patients with Colorectal Cancer. *Dig Dis Sci* 2013; 58:1717
- Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr* 2008; 138:562-6
- Pearson JR, Gill CI, Rowland IR. Diet, fecal water, and colon cancer--development of a biomarker. *Nutr Rev* 2009; 67:509-26

Pei K ; Ou J ; Huang J ; Ou S. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities J Sci Food Agric 2016; 96:2952-2962

Pericleous M, Mandair D, Caplin ME. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. J Gastrointest Oncol 2013;4:409-23

Pimpão RC, Ventura RM, Ferreira RB, Williamson G, Santos CN. Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry puree. Brit J Nutr 2015;113:454-463

Pimpão RC, Dew T, Figueira ME, McDougall GJ, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN, Williamson G. Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers. Mol Nutr Food Res 2014;58:1414-1425

Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, Klinder A, O'Riordan M, O'Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Van Loo J, Watzl B, Collins JK. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. Am J Clin Nutr 2007;85:488-96

Rafter J, Govers M, Martel P, Pannemans D, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Rowland I, Tuijtelars S, van Loo J. PASSCLAIM--diet-related cancer. Eur J Nutr 2004;43:S1147-S1184

Rafter JJ, Child P, Anderson AM, Alder R, Eng V, Bruce WR. Cellular toxicity of fecal water depends on diet. Am J Clin Nutr 1987;45:559-563

Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. Mol Nutr Food Res 2008 May;52:507-26

Riaz M, Bilal A, Ali MS, Fatima I, Faisal A, Sherkheli MA, Asghar A. Natural products from *Cuscuta reflexa* Roxb. with antiproliferation activities in HCT116 colorectal cell lines. Nat Prod Res 2017;31:583-587

Roy N, Narayanankutty A, Nazeem PA, Valsalan R, Babu TD, Mathew D. Plant Phenolics Ferulic Acid and P-Coumaric Acid Inhibit Colorectal Cancer Cell Proliferation through EGFR Down-Regulation. Asian Pac J Cancer Prev 2016;17:4019-23

Russell W, Duthie G. Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. Proc Nutr Soc 2011;70:389-96

Russell WR, Scobbie L, Labat A, Duthie GG. Selective bio-availability of phenolic acids from Scottish strawberries. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53:85-91

Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977;31:107-33

Shaw E, Warkentin MT, McGregor SE, Town S, Hilsden RJ, Brenner DR. Intake of dietary fibre and lifetime non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) use and the incidence of colorectal polyps in a population screened for colorectal cancer. *J Epidemiol Community Health* 2017;71:961-969

Shi N, Clinton SK, Z Liu Z, Wang Y, Riedl KM, Schwartz SJ, Zhang X, Pan Z, Chen T. Strawberry Phytochemicals Inhibit Azoxymethane/Dextran Sodium Sulfate-Induced Colorectal Carcinogenesis in Crj: CD-1 Mice. *Nutrients* 2015; 7:1696-1715

Stadler J, Sing Yeung K, Furrer R, Marcon N, Himal HS, Bruce WR. Proliferative activity of rectal mucosa and soluble fecal bile acids in patients with normal colons and in patients with colonic polyps or cancer. *Cancer Letters* 1988; 38:315-320

Steck SE, Guinter M, Zheng J, Thomson CA. Index-Based Dietary Patterns and Colorectal Cancer Risk: A Systematic Review. *Adv Nutr* 2015;6:763-773

Stoner GD, Sardo C, Apseloff G, Mullet D, Wargo W, Pound V, Singh A, Sanders J, Aziz R, Casto B, Sun X. Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days. *J Clin pharmacol* 2005;45:1153-1164

Thomasset S, Berry DP, Cai H, West K, Marczyklo TH, Marsden D, Brown K, Dennison A, Garcea G, Miller A, Hemingway D, Steward WP, Gescher AJ. Pilot Study of Oral Anthocyanins for Colorectal Cancer Chemoprevention. *Cancer Prev Res* 2009;2:625-33

Tomás-Barberán FA, Selma MV, Espín JC. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016;19:471-476

Tomás-Barberán FA, García-Villalba R, González-Sarriás A, Selma MV, Espín JC. Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *J Agric Food Chem* 2014; 62:6535-6538

Truchado P, Larrosa M, García-Conesa MT, Cerdá B, Vidal-Guevara ML, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Strawberry processing does not affect the production and urinary excretion of urolithins, ellagic acid metabolites, in humans. *J Agric Food Chem* 2012;60:5749-5754

Valdés L, Cuervo A, Salazar N, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, González S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food Funct* 2015;6:2424-39

Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, Fogliano V. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr* 2007;137:2043-8

Wang LS, Burke CA, Hasson H, Kuo CT, Molmenti CL, Seguin C, Liu P, Huang TH, Frankel WL, Stoner GD. A Phase Ib Study of the Effects of Black Raspberries on Rectal Polyps in Patients with Familial Adenomatous Polyposis. *Cancer Prev Res* 2014;7:666-74

Wang LS, Arnold M, Huang YW, Sardo C, Seguin C, Martin E, Huang TH, Riedl K, Schwartz S, Frankel W, Pearl D, Xu Y, Winston J 3rd, Yang GY, Stoner G. Modulation of genetic and epigenetic biomarkers of colorectal cancer in humans by black raspberries: a phase I pilot study. *Clin Cancer Res* 2011;17:598-610

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123:309-1

Williamson G, Clifford MN. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br J Nutr* 2010; 104:S48-S66

Wong SH, Zhao L, Zhang X, Nakatsu G, Han J, Xu W, Xiao X, Kwong TNY, Tsoi H, Wu WKK, Zeng B, Chan FKL, Sung JJY, Wei H, Yu J. Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology* 2017;153:1621-1633

World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer. 2017

Zhao C, Giusti MM, Malik M, Moyer MP, Magnuson BA. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J Agric Food Chem* 2004;52:6122-6128

Liitteet

Liite 1. Ohjeet ulostenäytteen ottoa varten

KarniMari-tutkimus 2014, Helsingin yliopisto, ravitsemustiede

Ohjeet ulostenäytteen ottoa varten (Aloituskäynti)

Hyvä tutkimushenkilö,

Olet saanut näytteenottovälineet ulostenäytteen keräämiseksi. Kerää näytteet **kahdelta päivältä ennen kuin aloitat tutkimustuotteiden syömisen varsinaisella tutkimusjaksolla 10.10.2014.**

Styroxlaukku sisältää seuraavat näytteenottoon tarvittavat välineet:

- 2 kylmävaraajaa
- Kaarimaljoja
- Iso valkoinen muovipussi
- Kertakäyttölusikoita 2 kpl
- Kertakäyttöhanskoja näytteenottoa varten (2 paria)
- Vaaka
- Nimelläsi varustettu pakasterasia (Orthex)
- 2 minigrip-pussia, joissa molemmissa
 - o 1 kannellinen muovipurkki
 - o 1 näyteputki, jossa näytteenottoa varten sisäänrakennettu lusikka
- Permanenttitussi
- Lomake näytteenkeräystietoja varten

Näytteenotto:

Lue ohje huolella läpi ennen näytteenottoa.

- **Pakasta kylmävaraajat** hyvissä ajoin ennen näytteen palautusta. Näytteet palautetaan tutkimusyksikköön pakastettuna ja kylmävaraajien kanssa styroxlaukkuun pakattuna.
- **Ulostenäyte kerätään kahdelta päivältä.** Päivien ei tarvitse olla peräkkäiset, mutta mielellään lähellä toisiaan.
- **Kaikki** keräyspäivän tuotokset **punnitaan ensin vaa’alla** ja painot merkitään lomakkeeseen. Vain **yhdestä uloste-erästä per päivä otetaan näytteet** seuraavaa ohjetta noudattaen:
 - o Ulostaa kaarimaljalle. **Punnitse tuotos vaa’alla ja merkitse paino lomakkeeseen.**
 - o Jos ulostat useita kertoja päivässä, muistathan punnita kaikki tuotoksesi ja merkitä lomakkeeseen.
 - o Ota päivittäinen näyte vain yhdeltä ulostekerralta, ei siis kaikilta kerroilta.
 - o Ota näyteputki ja –purkki pussista, jossa lukee **PÄIVÄ 1.**
 - o Ota ulostetta ensin näyteputkeen (tarrassa: Mikronäyte A) putken sisältämällä lusikalla **reilun lusikallisen** verran ulosteen keskikohdalta, ei alussa tulevasta mahdollisesti kovemmasta ”tulpasta”. Sulje korkki huolellisesti.

- Ota ulostetta (keskikohdalta) kertakäyttölusikalla kannelliseen muovipurkkiin (tarrassa: NÄYTE1A) vähän **yli puolet** purkin tilavuudesta. Sulje kansi huolellisesti. Kaikkea ulostetta ei tarvitse laittaa putkeen, kaada loput pönttöön.
- Huolehdi, ettei ulostetta jää putken tai purkin ulkopuolelle.
- **Merkitse** putkessa sekä purkissa olevaan tarraan **näytteenottopäivämäärä** permanenttitussilla.
- **Laita putki ja purkki minigrip-pussissa** Orthex-pakasterasiaan, jossa on nimesi, ja **pakasta välittömästi**.
- Suorita näytteenotto samalla tavalla myös PÄIVÄNÄ 2.

Näytteiden säilytys kotona ja kuljetus tutkimusyksikköön:

- **Säilytä näytteet pakastimessa** nimikoidussa pakasterasiassa siihen asti, kunnes toimitat näytteet Viikkiin.
- Tuo pakastetut näytteet **pakastettujen kylmävaraajien** kanssa styroxlaukussa.
 - Kuljetusta varten laita kylmävaraajat ja Orthex-pakasterasiassa olevat näytteet isoon muovipussiin ja solmi pussi tiiviiksi paketiksi. Tällä varmistetaan, että näyte ei pääsisi sulamaan kuljetuksen aikana.
- Pakastetut näytteet voit palauttaa tutkimusyksikköön Viikkiin
 - milloin tahansa **ke-to 1.-2.10.** klo 7:45-14:00 sekä **ma-to 6.-9.10.** klo 7:45-14:00 (Huone 2034c, ravitsemustieteen osasto)
 - tai kun tulet noutamaan tutkimustuotteita tutkimusyksiköstä torstaina 9.10.
- Minimoi näytteiden oloaika pakastimen ulkopuolella, **näytteet eivät saa sulaa** kuljetuksen yhteydessä!
- Muistathan palauttaa myös täytetyn lomakkeen.

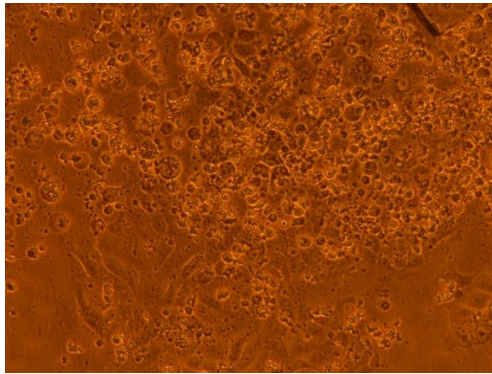
Näytteenotto ja purkitus on helpointa suorittaa kotona, missä kylmäsäilytys/pakastaminen onnistuu paremmin. Jos ulostekertoja on useita päivän aikana, **varaudu punnitsemaan ulosteesi myös kodin ulkopuolella**. Tällöin riittää, että pidät mukanasasi vaakaa, kaarimaljaa, ja punnituslomaketta. Varaa mukaasi myös roskapussi, jossa voit laittaa likaisen kaarimaljan roskikseen. Ulostaa kaarimaljalle, punnitse ja merkitse paino lomakkeeseen.

Kaikissa näytteenottoon liittyvissä kysymyksissä voit olla yhteydessä Maija Marttiseen (puh.050 5898154, maija.marttinen@helsinki.fi).

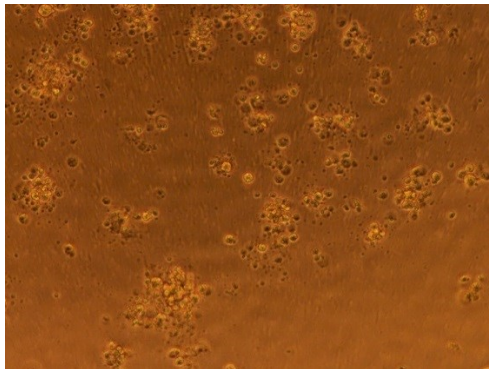
KIITÄMME SINUA OSALLISTUMISESTASI!

Ystävällisin terveisin,
KarniMari-tutkimusryhmä
Helsingin yliopisto, ravitsemustieteen osasto,
Viikin kampus, EE-talo 2. krs

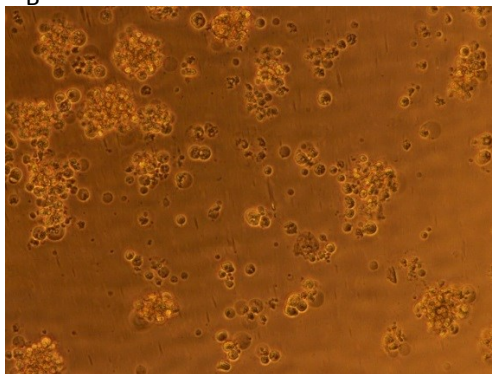
Liite 2. Esimerkkikuvia soluista



A

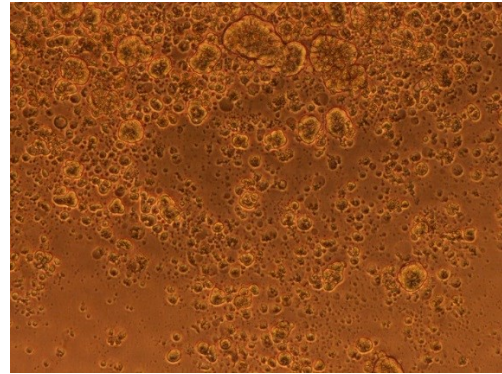


B

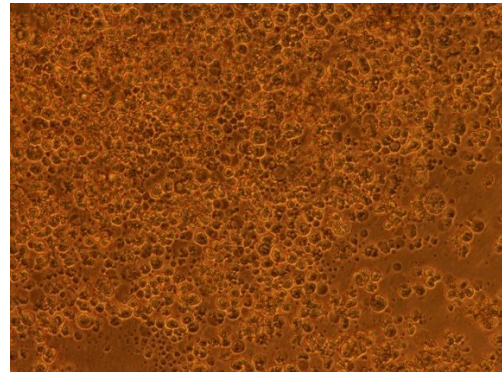


C

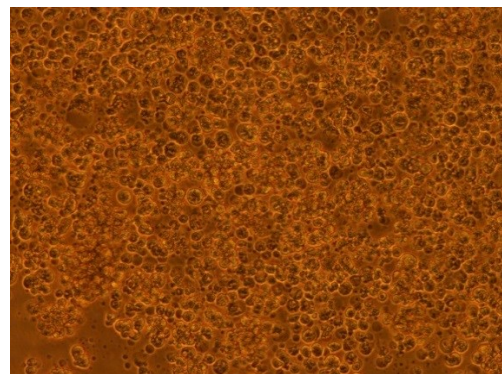
Kuva 9. A-C: HCA-7-soluja altistettu koehenkilön nro 7 ulosteveden 10 % (A), 20 % (B) ja 30 % (C) laimennoksille vuorokauden ajan. Viabiliteetit altistuksen jälkeen olivat vastaavasti 84,7 %, 37,4 % ja 34,7 %. Kuvassa A valtaosa soluista on kiinni alustassa, kuvissa B ja C näkyy vain irronneita soluja.



D

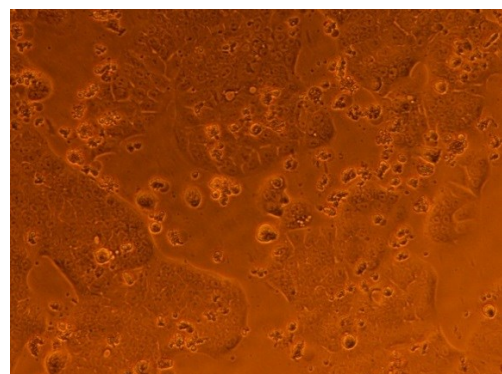


E



F

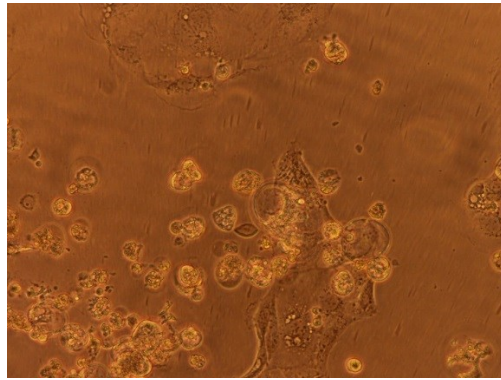
D-F: HCA-7-soluja altistettu koehenkilön nro 24 ulosteveden 10 % (D), 20 % (E) ja 30 % (F) laimennoksille vuorokauden ajan. Viabiliteetit altistuksen jälkeen olivat vastaavasti 39,0 %, 50,5 % ja 41,1 %. Kaikissa kuvissa näkyy vain alustasta irronneita soluja



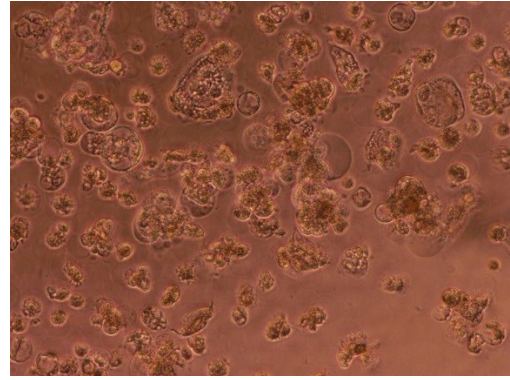
G

G: HCA-7 kontrollisoluja, ei altistettu ulostevedelle.

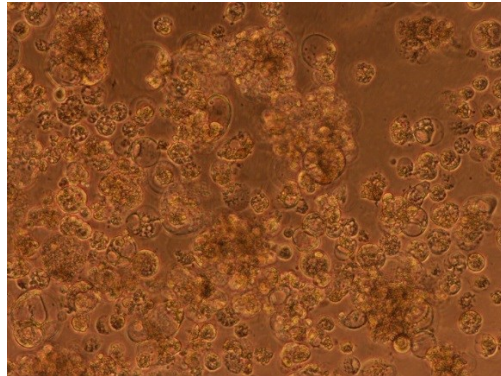
Kuvat on otettu kuopan keskiosasta 10X suurennoksella. Kuoppien ulkoreunoilla voi olla kiinnittyneitä soluja, jotka eivät näy kuvissa.



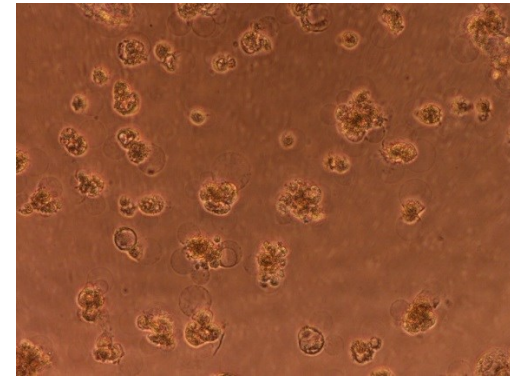
A



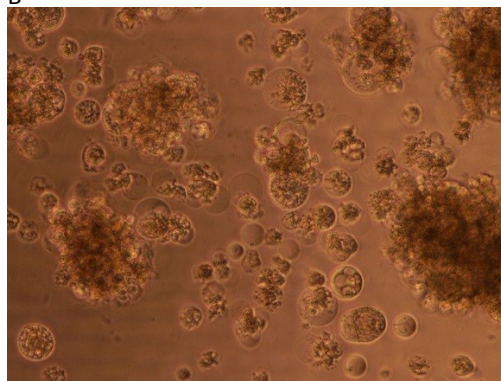
D



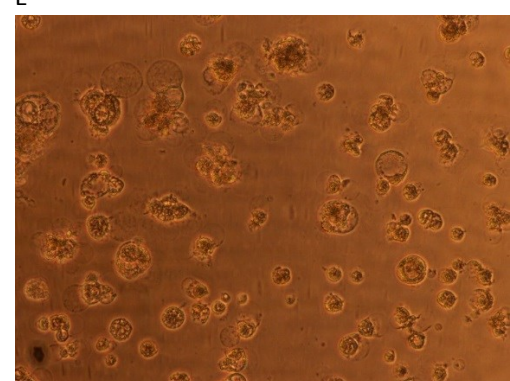
B



E



C



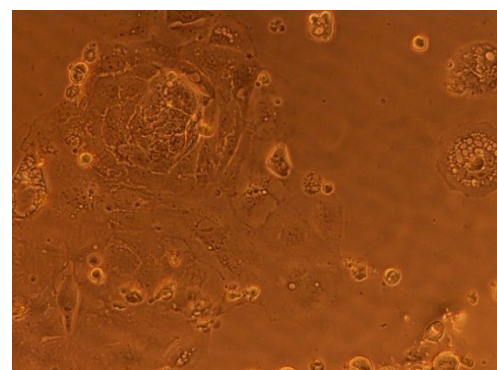
F

Kuva 10. A-C: Caco-2 soluja altistettu koehenkilön nro 7 ulosteveden 10 % (A), 20 % (B) ja 30 % (C) laimennoksille vuorokauden ajan. Viabiliteetit altistuksen jälkeen olivat vastaavasti 91,8 %, 41,6 % ja 33,1 %. Kuvassa a solut ovat pääosin kiinnittyneinä alustaan, kuvissa B ja C näkyy irronneita soluja.

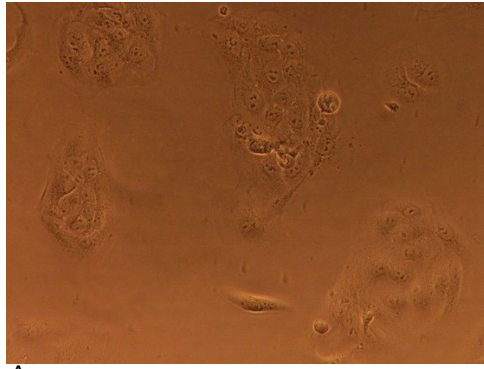
D-F: Caco-2 soluja altistettu koehenkilön nro 24 ulosteveden 10 % (D), 20 % € ja 30 % (F) laimennoksille vuorokauden ajan. Viabiliteetit altistuksen jälkeen olivat vastaavasti 25,7 % 9,2 % 11,0 %. kaikissa kuvissa näkyy vain irronneita soluja

G: Caco-2 kontrollisoluja, joita ei altistettu ulostevedelle.

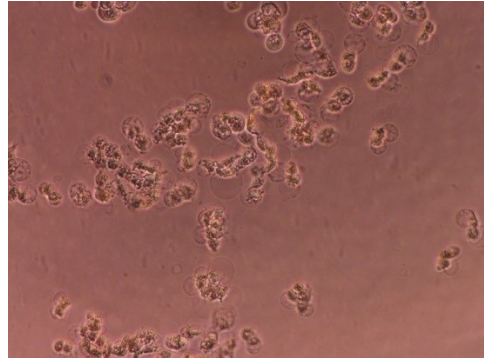
Kuvat on otettu kuopan keskiosasta 10X suurennoksella. Kuoppien ulkoreunoilla voi olla kiinnittyneitä soluja, jotka eivät näy kuvissa.



G



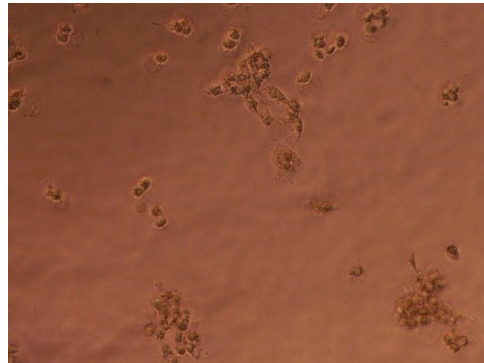
A



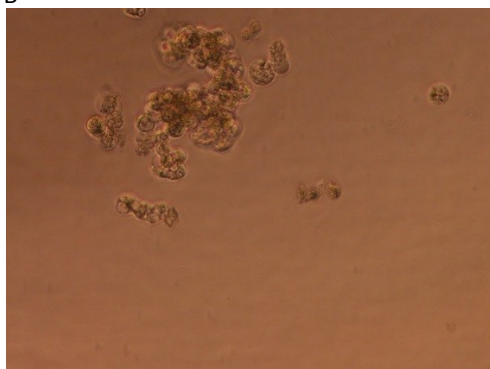
D



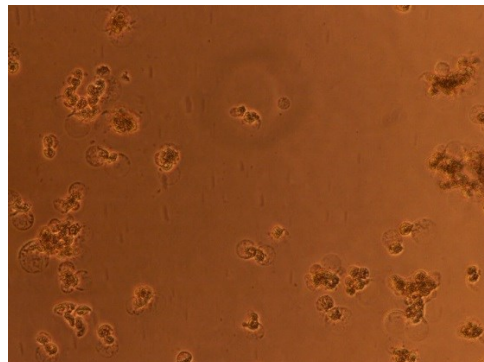
B



E



C



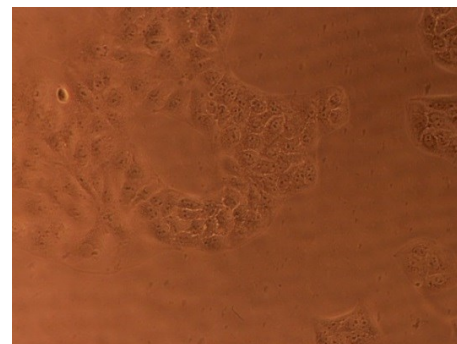
F

Kuva 11. A-C: CV1-P-soluja altistettu koehenkilön nro 7 ulosteveden 10 % (A), 20 % (B) ja 30 % (C) laimennoksille vuorokauden ajan. Viabiliteetit altistuksen jälkeen olivat vastaavasti 90,8 %, 52,4 % ja 28,5 % kontrolliin verrattuna. Kuvissa A ja B solut ovat pääosin kiinni kasvatusalustassa, kuvassa C solut ovat irronneet.

D-F: CV1-P-soluja altistettu koehenkilön nro 24 ulosteveden 10 % (D), 20 % (E) ja 30 % (F) laimennoksille vuorokauden ajan. Solujen viabiliteetti altistuksen jälkeen oli vastaavasti 18,6 %, 9,5 % ja 11,9 % kontrollisoluihin verrattuna. Kaikissa kuvissa solut ovat irronneet kasvatusalustastaan.

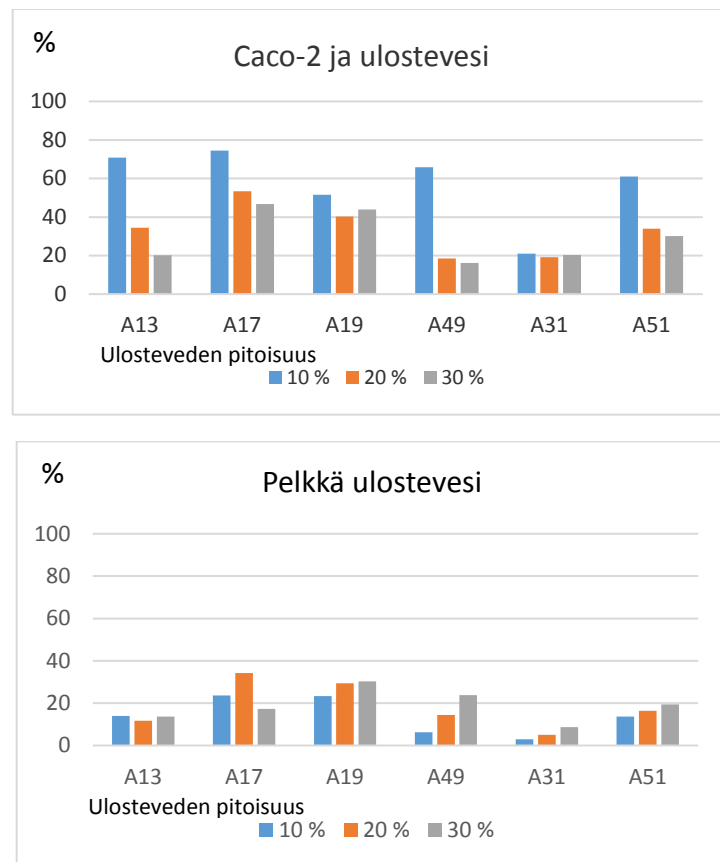
G: CV1-P kontrollisoluja, joita ei altistettu ulostevedelle.

Kuvat on otettu kuopan keskiosasta 10X suurennoksella. Kuoppien ulkoreunoilla voi olla kiinnittyneitä soluja, jotka eivät näy kuvissa.



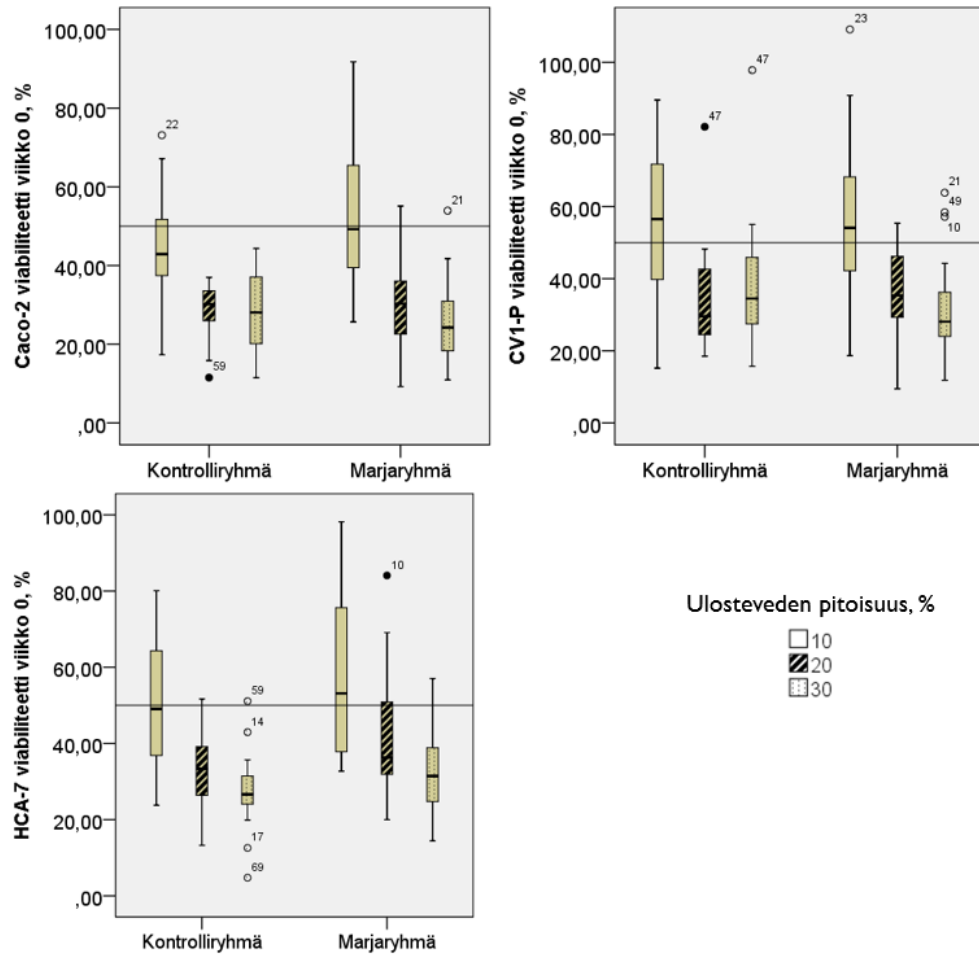
G

Liite 3. Ulosteveden ja CCK-8-reagenssin interaktion testaus



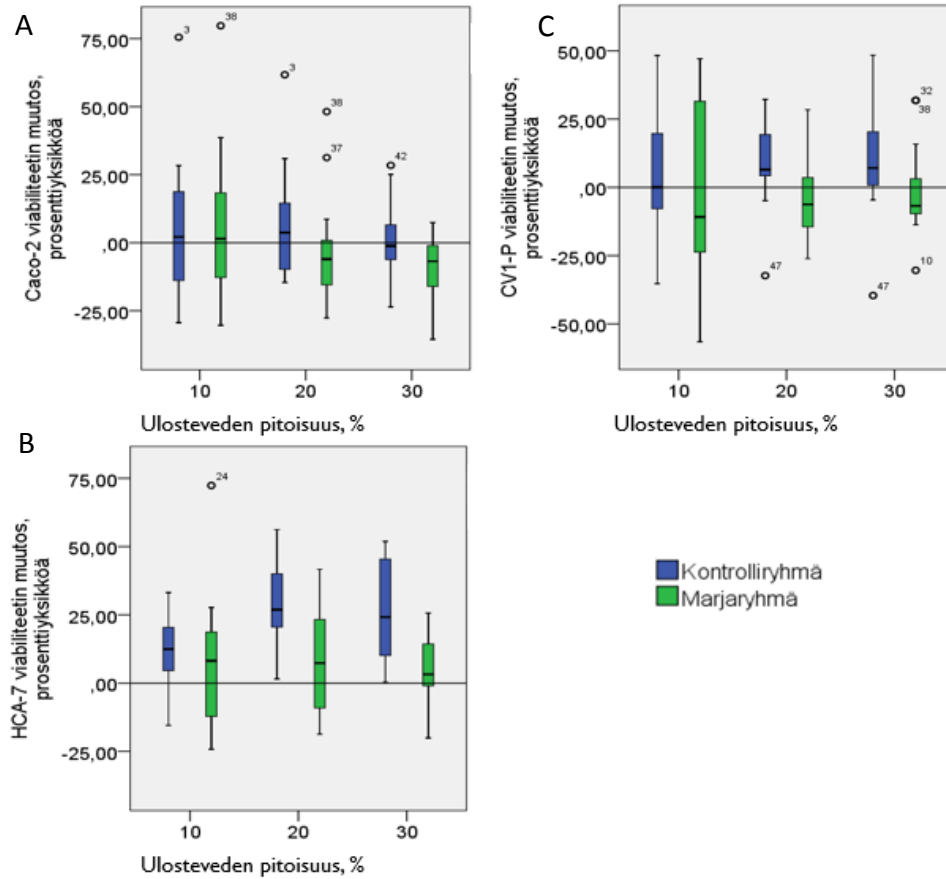
Kuva 12. A: Caco-2-solujen viabiliteetti valikoiduille ulostevesille altistamisen jälkeen. B: Samojen ulostevesien ja CCK-8 reagenssin interaktion tuottama viabiliteettilukema ilman solujen vaikutusta. Huomioi, että Interaktion prosenttiluku riippuu kontrollisolujen määrästä. Pelkkä kasvatusliuos ilman ulostevettä tai soluja antoi noin 6,5 % viabiliteettiluvun tällä solumäärällä. Tässä kokeessa soluja saatiin kuoppalevyille keskimääräistä vähemmän, minkä vuoksi interaktion suuruus voi olla jonkin verran korostunut.

Liite 4. Solujen viabiliteetit ulostevesialtistuksen jälkeen intervention alkupisteessä



Kuva 13. Ulostevedelle altistettujen solujen viabiliteetti marjaryhmässä ja kontrolliryhmässä (% kontrollisoluista) intervention alkupisteessä. Kuvissa vertailuviiva on asetettu kohtaan, jossa viabiliteetti on 50 % kontrollisoluista. Suorakaiteen sisään sijoittuu 50 % havainnoista, ja vaakaviiva vastaa mediaania. Janojen päät vastaavat pienintä ja suurinta arvoa. Poikkeavat havainnot on merkitty kyseessä olevan näytteen tutkimusnumerolla. Interventoryhmien välillä ei ole merkitseviä eroja ($p > 0,05$, Wilcoxon merkittyjen sijalukujen testi).

Liite 5: Solujen viabiliteetin muutos intervention alkupisteestä loppupisteeseen



Kuva 14. Viabiliteetin muutos (prosenttiyksikköä) alkupisteestä loppupisteeseen ryhmittäin. Suorakaiteen sisään sijoittuu 50 % havainnoista, ja poikkiviiva vastaa mediaania. Janojen päät vastaavat pienintä ja suurinta arvoa. Poikkeavat havainnot on merkitty kyseessä olevan näytteen tutkimusnumerolla. Kuvissa vertailuviiva on asetettu kohtaan, jossa ero alkupisteen ja loppupisteen viabiliteetin välillä on 0 prosenttiyksikköä. A: Caco-2, alku- ja loppupisteen ero on merkitsevä marjaryhmän 30 % -ulostevesipitoisuudella ($p < 0,05$, Wilcoxon merkittävien sijalukujen testi). Viabiliteetti oli kontrolliryhmässä keskimäärin hieman suurempi ja marjaryhmässä hieman pienempi intervention loppupisteessä kuin alkupisteessä.

B: HCA-7, alku- ja loppupisteen ero merkitsevä marjaryhmän 30 % -ulostevesipitoisuudella ja kontrolliryhmän 10 %, 20 % ja 30 % -ulostevesipitoisuuksilla ($p < 0,05$, Wilcoxon merkittävien sijalukujen testi). Viabiliteetti oli kummassakin interventioryhmässä suurempi intervention loppupisteessä kuin alkupisteessä, mutta marjaryhmässä muutos oli huomattavasti pienempi (kuva 14B). C: CV1-P, alku- ja loppupisteen ero on merkitsevä kontrolliryhmän 20 % ja 30 % -ulostevesipitoisuuksilla ($p < 0,05$, Wilcoxon merkittävien sijalukujen testi). Viabiliteetti oli kontrolliryhmässä keskimäärin hieman suurempi ja marjaryhmässä hieman pienempi intervention loppupisteessä kuin alkupisteessä.